Über wachstumsbeeinflussende Stoffe der Zypressenwolfsmilch

(Euphorbia cyparissias)

---

von

Paul Reichling

aus Nürnberg

1964

1964 N 86

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41538102_0073

Über wachstumsbeeinflussende Stoffe der Zypressenwolfsmilch (Euphorbia cyparissias)

Der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg
zur Erlangung des Doktorgrades

vorgelegt von
Paul Reichling
aus Nürnberg
1964

Als Dissertation genehmigt von der
Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Erlangen-Nürnberg

Tag der mündlichen Prüfung: 22.Juli 1964
Dekan: Universitätsprofessor Dr. H.Behrens
Berichterstatter: Universitätsprofessor Dr. H.Schildknecht
Berichterstatter: Universitätsprofessor Dr. G.Hesse

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK - LEIDEN -

Meiner lieben Frau

Diese Arbeit wurde in der Zeit von Mai 1961 bis Januar 1964 am Institut für Organische Chemie der Universität Erlangen-Nürnberg angefertigt.

Meinem hochverehrten Lehrer,
Herrn Universitätsprofessor Dr. H. Schildknecht,
danke ich für die Anregung zu dieser Arbeit und für sein wohlwollendes Interesse bei deren Durchführung.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung

1. Einleitung 1
2. Bisherige Ergebnisse 3
3. Hemmstoffe bei Euphorbia cyparissias 4
4. Der biologische Test mit Mohnsamen (papaver somniferum) 6
5. Chromatografie der Hemmstoffe und Biotest . . 7
6. Prüfung des Trennungsganges 8
7. Weiterentwicklung der Trennung 15
8. Versuche zur präparativen Isolierung von Hemmstoff 25
9. Versuche zur Klassifizierung der Hemmsubstanz 33
10. Quantitative Aufarbeitung von gesunden und befallenen Euphorbien 34
11. Auftrennung der nicht an Aktivkohle adsorbierbaren Anteile 36

Experimentelles

1. Sammeln der Pflanzen 40
2. Zur Durchführung des Tests mit Weizenblattabschnitten 40
3. Zum Biotest mit Kresse(Lepidium)- und mit Mohn(Papaver)-samen 41
4. Modifizierung der Aufarbeitung auf Hemmstoffe 41
5. Aufarbeitung auf Hemmstoffe präparativ 42
6. Extraktion der aus dem Essigester gewonnenen Rückstände (Rohsubstanz) mit Chloroform . . . 43
7. Craigverteilung der Hemmstoffe 43
8. Dünnschichtplatten mit Cellulose 44
9. Säulenchromatographie (Gradientenelution) . . 44
10. Elektrophorese 45
11. Sprüh- und Nachweisreagenzien 46
12. Tüpfelanalyse nach Feigl 48
13. Trennung der Fraktion 3 an Polyamid präparativ 51

Literaturverzeichnis 53

Zusammenfassung

Gesunde und vom Rostpilz Uromyces Pisi infizierte Pflanzen von Euphorbia cyparissias wurden extrahiert. In den gereinigten und mittels Papier- und Dünnschichtchromatographie aufgetrennten Extrakten konnten wachstumsfördernde und -hemmende Stoffe festgestellt werden. Die Wuchsstoffe sind nicht vom Indoltypus, sondern gibberellinähnlich. Ihr Nachweis wurde mit Weizenblattabschnitten durchgeführt.

Die in den Extrakten vorhandenen Wachstumsinhibitoren wurden eingehend untersucht. Ihre biologische Aktivität konnte mit Keimungstesten an Gartenkresse- und Mohnsamen bestimmt werden.

Nach eingehenden analytischen Versuchen wurde für die nachgewiesenen Hemmstoffe ein Trennungsgang ausgearbeitet und deren präparative Isolierung angestrebt. Durch Anwendung der multiplikativen Verteilung, Trennung an Kieselgelsäulen und mikropräparative Dünnschichtchromatographie auf Cellulose gelang eine hohe Anreicherung der Inhibitoren. Unter Verwendung der Papierelektrophorese konnte ein einheitlicher Hemmstoff erhalten werden. Mittels chemischer Reaktionen und mit Hilfe seines IR- und UV- Spektrums konnte er klassifiziert werden.

1. Einleitung

Die Zypressenwolfsmilch (Euphorbia cyparissias) zeigt beim Befall durch einen Pilz eine völlige Veränderung ihrer äußeren Erscheinungsform. Die Pflanze, die normalerweise kräftige, buschige verzweigte Stengel aufweist, ist dann langaufgeschossen und die Stengel sind meist unverzweigt, sodaß der ungeschulte Beobachter nicht erkennt, daß beide Formen zu ein und derselben Pflanze gehören (Abb.1).

Abb.1 Gesunde und kranke Triebe von Euphorbia cyparissias. Rechts die infizierten Teile 1/3 nat.Gr.

Bei näherem Zusehen ergeben sich noch weitere Unterschiede. Die Blätter der gesunden Pflanzen sind lang und schmal, die der kranken kurz, breit und zum Teil nach unten gekrümmt. Während erstere von kräftiger, dunkelgrüner Farbe sind, erscheinen letztere blaß gelbgrün bis kräftig gelb. Das Auffallenste an der infizierten Pflanze sind die an der Blattunterseite auftretenden, orangefarbenen Sporenlager. Diese Veränderungen von E.cyparissias werden durch einen phytopathogenen Parasiten, den Rostpilz Uromyces pisi, der zu den Uredineen gehört, hervorgerufen.

Die genannten Beobachtungen sind dem Botaniker schon seit 1875 bekannt. Schröter berichtet darüber in einem Artikel, den er "Beobachtungen über die Zusammengehörigkeit von Aecidium Euphorbiae Persoon und Uromyces Pisi (Strauss)" überschreibt (25). Im Laufe der Jahre wurden von Botanischer Seite eine Reihe von Arbeiten über diese interessante

Pflanzenkrankheit publiziert (10,12,16,27,30), wobei die Art der Infektion und die daraus resultierende Verbildung der Pflanze abgehandelt werden. Daß das Problem auch heute noch nicht gelöst ist, beweist eine Veröffentlichung, in der Hartwich (9) 1955 nochmals Untersuchungen über die "Entwicklung von Uromyces pisi auf Euphorbia cyp." anstellt.

Auch die Pflanzenphysiologen haben sich mit dem Problem befaßt. Es wurde die Katalaseaktivität im Gewebe gesunder und kranker Pflanzen verglichen (31). Pilet (18) untersuchte zunächst den Wuchsstoffgehalt der Blätter beider Pflanzenformen und später die Aktivität der den Wuchsstoffabbau regulierenden Enzyme (19).
Zu dem beschriebenen Krankheitsbild gibt es ein Analogon, nämlich die japanische Reiskrankheit, genannt "Bakanae" (verrückte Schößlinge). Auch sie wird durch einen Pilzbefall der jungen Reispflanzen hervorgerufen. Stowe und Yamaki (29) berichten in ihrer Veröffentlichung "The History and Physiological Action of the Gibberellins" eingehend alle wichtigen Tatsachen der Reiskrankheit und ihre Folgen. Als besonders charakteristisch erwähnen sie das Auftreten langer dünner Pflanzen, die ihre nicht infizierten Nachbarn an Größe weit übertreffen: "Infizierte Pflanzen sind nicht nur größer, sondern die Internodien und Blattscheiden sind auch länger, schmäler und dünner, Der Winkel, den die Blätter mit dem Stengel bilden, ist vergrößert. Die Pflanzen erscheinen im allgemeinen chlorotisch. Sie sterben schon vor dem Blühen ab. Der die Krankheit verursachende Pilz gehört zur Gruppe der Fungi imperfekti und heißt Gibberella fujikuroi.
Die zahlreichen Übereinstimmungen zwischen dem Krankheitsbild der Reiskrankheit und der von Uromyces pisi auf E. cyparissias hervorgerufenen Erkrankung veranlaßten uns dazu, die Frage zu prüfen, ob hier nicht gleiche Ursachen vorliegen.

2. Bisherige Ergebnisse

In einer vorhergehenden (22) und zu Beginn der vorliegenden Arbeit untersuchten wir Extrakte der Cypressenwolfsmilch auf Wuchsstoffe.

Es konnte auch bei der Auftrennung der Extrakte von infizierter E.cyparissias mittels Papier- und Dünnschichtchromatographie ein gibberellinähnlicher Wuchsstoff nachgewiesen werden. Wirkstoffe vom Indoltypus und mit Ninhydrin reagierende Komponenten wurden dagegen nicht aufgefunden.
Der biologische Test auf Gibberelline wurde mit Weizenblattabschnitten ausgeführt. Von uns angestellte, eingehende Versuche unter verschiedenen Bedingungen erlauben eine Verwendung dieses Biotests zur halbquantitativen Bestimmung.
In Erweiterung dieser Untersuchungen interessierten wir uns auch für die Extrakte gesunder Pflanzen. Zur Gegenüberstellung stellten wir ebenfalls Chromatogramme her, die nach dem Entwickeln in destilliertem Wasser und Markierung unter der UV-Lampe in 4 Zonen zerschnitten wurden. Die Rf-Werte der einzelnen Zonen waren analog denen der infizierten Pflanzen (Tab.1)

Zone	Rf-Wert	Farbe im UV
1	1,00 - 0,80	farblos
2	0,80 - 0,55	blau
3	0,55 - 0,30	violett
4	0,30 - 0,10	blau

Tabelle 1

Die Chromatogramme wurden entsprechend diesen Zonen zerschnitten und jede Zone mit 10 - 20 ml Äthanol 48 Stunden extrahiert. Die Eluate dampften wir auf dem Wasserbad zur Trockene ein und prüften sie chromatographisch auf ihre Reinheit. Die so gewonnenen

Eluate verwendeten wir zum Test. Hierbei traten neue Gesichtspunkte auf. Die 4 Zonen aus den Chromatogrammen befallener Pflanzen ergaben beim Test Werte, welche im positiven Bereich gegenüber den Kontrollen lagen. Zone 1 und verschiedentlich auch Zone 4 hatten die höchsten Zuwachsraten. Erstaunlicherweise lagen aber bei den Eluaten gesunder Pflanzen die Werte mehr oder weniger tief im negativen Bereich. Sie enthalten also offensichtlich nicht nur weniger Wuchsstoff, sondern sogar ausgesprochene Inhibitoren.
In einer zweiten Versuchsreihe prüften wir die gleichen Eluate befallener Pflanzen, die für den Weizentest verwendet worden waren, mit dem Papavertest (siehe Seite 7) auf Inhibitoren. Das Ergebnis war negativ; es ließen sich keine Hemmstoffe nachweisen. Ein Versuch mit dem Lepidiumkeimungstest nach Libbert verlief ebenfalls negativ. Die Eluate gesunder Pflanzen dagegen sprachen auf beide Hemmstoffteste sofort an. Die Hemmung war sogar größenordnungsmäßig stärker als die Wachstumsraten beim Test befallener Pflanzen.
Die vorliegende Arbeit ist der Untersuchung dieser Hemmstoffe gewidmet.

3. Hemmstoffe bei Euphorbia cyparissias

Wie die Wuchsstoffe, so sind auch die Hemmstoffe entscheidend am physiologischen Geschehen der Pflanzen beteiligt. Sie haben wie diese Hormoncharakter und kommen nur in geringsten Mengen in der Pflanze vor. Dies ist ein wichtiger Punkt dafür, daß bis heute noch nichtviel über die chemische Natur dieser Stoffe bekannt geworden ist. Zu ihrer präparativen Isolierung aus Pflanzenmaterial bedarf es einer Anreicherung der wirksamen Komponenten in den Pflanzenauszügen, die über mehrere Zehnerpotenzen geht. Als Beispiel sei hier die aus Guayule (Parthenium argentatum Compositae) von Bonner und Galston (3) isolierte Transzimtsäure angeführt. Die aus 270 l

Lösung, welche 30 Tage lang durch Gefäße mit insgesamt 240 Guayulesträuchern geleitet worden war, gewonnene Substanz reichte noch nicht zur Analyse. Erst der Extraktionsrückstand von 20 000 großen Wurzeln der Pflanze, die 24 Stunden mit destilliertem Wasser extrahiert worden waren, erbrachte die nötige Substanzmenge.

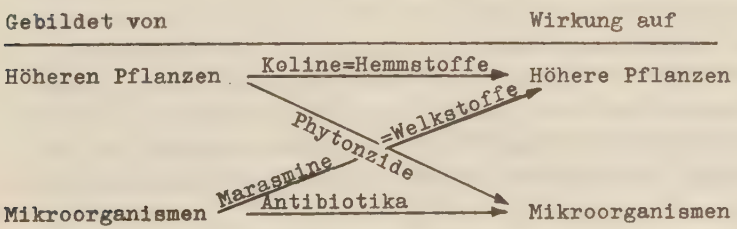
Hemmstoffe und Wuchsstoffe können nicht in jedem Fall als stofflich verschieden angesehen werden, da der Einfluß der Konzentration bei einem überdosierten Wuchsstoff eine Hemmwirkung ergibt und umgekehrt. Ein Beispiel hierfür ist das von Schildknecht und Rauch (23) aus Blättern isolierte n-Hexen-2-al-1. Es konnte gezeigt werden, daß die Keimung von Pollenschläuchen von narcissus pseudonarcissus durch hohe Konzentrationen von Hexenal gehemmt wird, während geringe Konzentration fördernd wirkt (2).

Daneben existieren aber auch Stoffe, die nur als Inhibitoren wirken (4).

Während man bei der Betrachtung der Wuchsstoffe hauptsächlich an die im Pflanzeninneren wirksamen Regulationsvorgänge denkt, ist es bei den Hemmstoffen notwendig, auch die Umwelt der Pflanze zu berücksichtigen. Über die gegenseitige Beeinflußung der Pflanzen (20) ist schon sehr viel gearbeitet worden, besonders auf dem Gebiet der Nutzpflanzen, doch sind die Ergebnisse nur spärlich.

Will man aber eine Übersicht gewinnen, so ist es zweckmäßig, gewisse Definitionen und Unterscheidungen zu treffen und an Hand dieser ein schmales Band aus dem breiten Spektrum der gegenseitigen Beeinflußung herauszugreifen.

Grümmer (7) bringt hier folgendes Schema:



Die gegenseitige Beeinflußung von Pflanzen gleicher Art kann die verschiedensten Formen haben. Beispielsweise tritt bei der Befruchtung von Oenotheren (oenothera longiflora) eine von Schwemmle (26) festgestellte Selektivität ein, die den Mendelschen Regeln widerspricht. Hier muß man, wie Schildknecht und Benoni (24) zeigen konnten, chemotropisch wirksame Substanzen auf der Oberfläche der Samenanlagen annehmen, die das Pollenschlauchwachstum in die richtige Bahn lenken.
Dieser positiven stehen viele Arten der negativen Beeinflußung gegenüber. Ein Beispiel dafür ist die sogenannte "Selbstunverträglichkeit" vieler Nutzpflanzen, das heißt, die gleiche Pflanze kann nicht mehrere Jahre hintereinander am gleichen Ort angebaut werden, ohne sich selbst zu hemmen.

4. Der biologische Test mit Mohnsamen (papaver somniferum)

Zur Prüfung auf Hemmstoffe verwendeten wir den Lepidiumkeimungstest nach Libbert (13) und den Papavertest (6). Letzterer wurde von uns bevorzugt, da er nur sehr geringe Substanzmengen erfordert.
Die Versuchsanordnung ist etwa die gleiche wie beim Weizentest, nur werden an Stelle der Weizenblattabschnitte je 50 Mohnsamen (Weihenstephaner Hochzucht) [+] in einer Petrischale auf das Chromatographiepapier aufgelegt. Nach einer Bebrütungszeit von 24 - 27 Stunden bei 27°C im Dunkeln werden diejenigen Samen als gekeimt gezählt, bei denen die Radikula die Samenschale durchbrochen hat. Aus statistischen Gründen ist es unbedingt erforderlich, mindestens 4 Schalen parallel anzusetzen, da die Streuung in den einzelnen Schalen zuweilen sehr hoch sein kann. Man bezieht die Ergebnisse auf mitgeführte Blindproben, bei denen nur destilliertes Wasser zugesetzt wurde. Der Mittelwert der in den Kontrollen gekeimten Samen wird zu 100% angesetzt. Liegen Werte von substanzhaltigen Proben darüber, so liegt Wachstumsförderung vor, liegen sie da-

[+] Fa. Samen Pfizer, Stuttgart.

runter, so spricht man von Hemmung. Die Fehlergrenze der Methode sollte man nicht zu knapp ansetzen; um sicher zu sein, daß man keine Fehlschlüsse zieht, sind ± 10% auf alle Fälle ausreichend. Die tatsächliche Fehlergrenze, die an einigen hundert Mittelwerten der Kontrollen statistisch errechnet wurde, liegt weiter darunter.
Der Test spricht auch auf verschieden hohe Hemmstoffkonzentrationen an.

5. Chromatografie der Hemmstoffe und Biotest

Mit Hilfe des Keimungstests verfolgten wir die Hemmstoffe bei der Chromatografie. Von gleichen Mengen Substanz aus gesunden und infizierten Euphorbien wurden Chromatogramme angefertigt und in destilliertem Wasser entwickelt. Diese zerlegten wir, (wie auch schon früher für den Weizentest) in 10 Zonen mit $\Delta Rf = 0{,}10$. Außerdem wurde jede Zone noch in vier gleiche Streifen zerschnitten und diese parallel getestet. Die Ergebnisse mit Mohnsamen zeigt Abbildung 2. Der Unterschied zwischen den beiden Extrakten ist eklatant. Bei gesunden Pflanzen tritt eine Hemmung von über 80% auf. Dem Vergleich mit unseren früheren Ergebnissen mit Weizen dienen die Bilder 3 und 4. Hier sehen wir deutlich die Übereinstimmung zwischen den beiden Testen. Sowohl der Weizentest, der auf wachstumsfördernde und, wie wir sehen, auch auf hemmende Stoffe anspricht, als auch der Papavertest, der vorwiegend die keimungshemmenden Stoffe anzeigt, bringen die gleichen Ergebnisse.

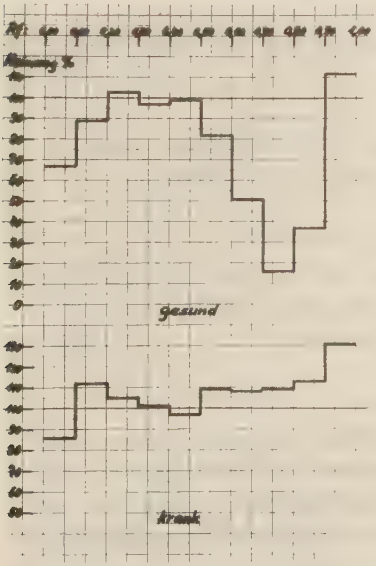


Abb. 2 Biotest des Chromatogramms

Dadurch ist bestätigt, daß die vorliegenden Inhibito-

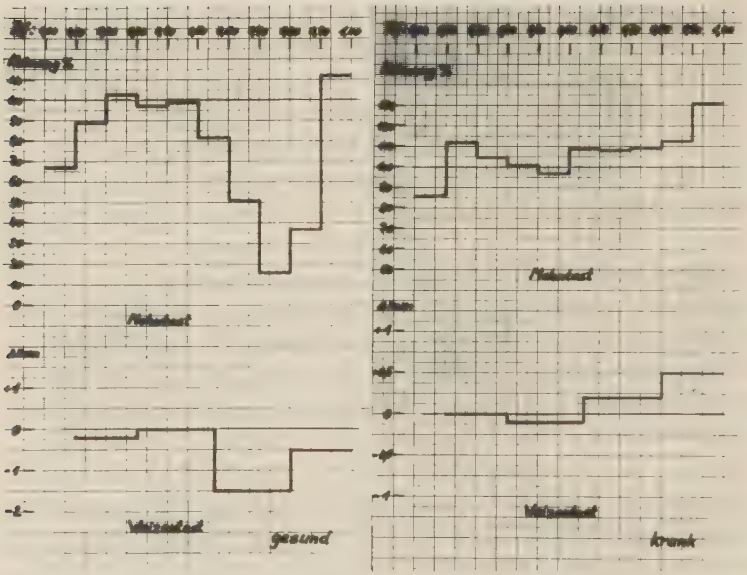


Abb. 3 u. 4 Vergleich von gesunden und erkrankten Pflanzen der E.cyparissias mit dem Weizen- und Mohntest

ren auf die Keimung und auf das Wachstum einen Einfluß ausüben, denn es werden zwei verschiedene Stadien der Pflanzenentwicklung gehemmt.
Chromatogramme, die in n-Butanol/Ammoniak entwickelt worden waren, ergaben beim Test das in Abb. 5 dargestellte Histogramm. Auch hier erkennt man eine breite Zone mit Hemmwirkung bei den gesunden Pflanzen.

6. Prüfung des Trennungsganges

Für die bisherigen Versuche hatten wir die gleichen Substanzgemische verwendet, welche bei der Aufarbeitung auf Wuchsstoffe als Rückstand verblieben. Möglicherweise enthielten diese jedoch nicht alle wirksamen Bestandteile. Es war deshalb naheliegend die einzelnen Stufen der Auf-

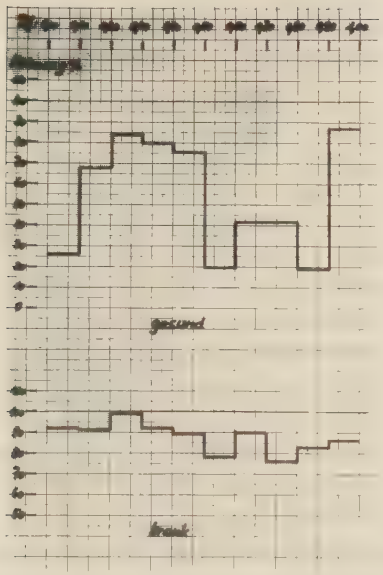


Abb.5 Biotest Chromatogramm
n-Butanol/Ammoniak

arbeitung mittels des Mohntests zu verfolgen.
Zuerst stellten wir uns aus jeweils 100g frischen gesunden und infizierten Pflanzen durch Zerkleinern in einem Entsafter frischen Pflanzenpreßsaft her. Dieser wurde zentrifugiert und biologisch getestet(Tab.2 u.3). Die Samen wurden nach 24 Stunden ausgezählt. Beide Preßsäfte hemmen die Samenkeimung in einer Konzentration von 10^{-2} bezogen auf das Gesamtvolumen an Preßsaft. Diese Tatsache ist dadurch zu erklären, daß die Preßsäfte sauer reagieren und außerdem die Enzyme noch voll wirksam sind. Auch nach 40 Stunden Testzeit ist noch Hemmung vorhanden. Es ist also unzweckmäßig, reinen Preßsaft zur Gewinnung von Hemmstoffen zu verwenden. Die enzymatische Tätigkeit sollte auf jeden Fall unterbunden werden, was am besten durch Extraktion der gefrorenen Pflanzen mit Äthanol oder Aceton geschieht.

conc.	%Keimung nach 24^h	40^h
10^{-2}	4	4
10^{-3}	65	95
10^{-4}	100	111
100g gesund		

Tabelle 2

conc.	%Keimung nach 24^h
10^{-2}	7
10^{-3}	80
10^{-4}	94
100g befallen	

Tabelle 3

Zur Probe wurden 500g gesunde Pflanzen zweimal mit Äthanol 40-48 Stunden extrahiert, der Alkohol abgezogen und der wässrige Rückstand getestet(Tab.4 u.5).

Mohntest	
conc.	%Keimung nach 26^h
$4 \cdot 10^{-3}$	1
10^{-3}	3
10^{-4}	50

Tabelle 4

Lepidiumtest			
conc.	%Keimung nach 16^h	24^h	40^h
$7 \cdot 10^{-4}$	22	26	stark gehemmt
10^{-4}	64	72	mittel gehemmt
10^{-5}	89	95	keine Hemmung

Tabelle 5

Die Hemmwirkung war außerordentlich stark. Auch der Lepidiumsamen, der sehr gut keimt, wurde noch nach 40 Stunden Versuchsdauer zu ca. 80% gehemmt. Die Samen waren zwar zunächst aufgesprungen, es war jedoch kein Keimling ausgetrieben. Die Kontrollen hatten sich zu diesem Zeitpunkt schon soweit entwickelt, daß sich das erste Blattpaar zeigte.

Der wässrige Extraktionsrückstand wurde nun mit Essigester ausgeschüttelt. Proben der wässrigen und der Esterfraktion ergaben beim Mohntest folgendes Ergebnis (Tab. 6 u.7)

conc.	%Keimung
10^{-3}	7
10^{-4}	69
10^{-5}	111
Essigester	

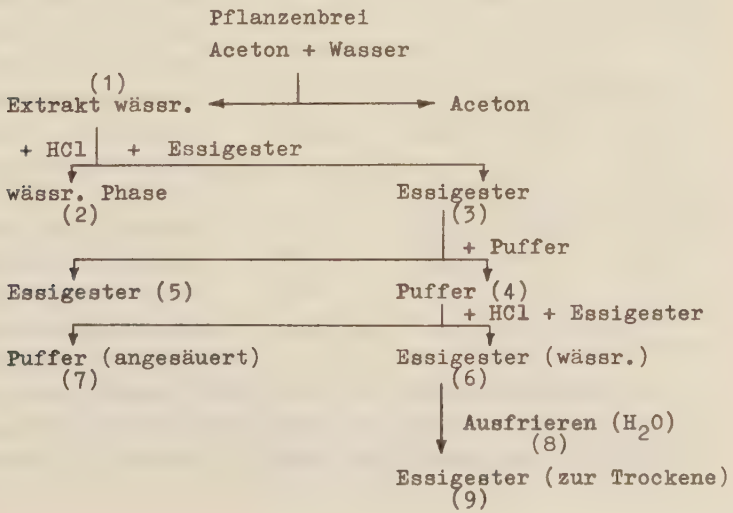
Tabelle 6

conc.	%Keimung
$2 \cdot 10^{-3}$	0
10^{-4}	94
wässriger Rückstand	

Tabelle 7

Wir sehen, daß sich die Aktivität aufteilt; dabei ist zu berücksichtigen, daß die wässrige Phase von einer Konzentrationsstufe zur nächsten völlig wirkunslos wird. Es ist zu vermuten, daß hierbei der osmotische Druck der Lösungen eine große Rolle spielt.

In Anlehnung an die frühere Aufarbeitung auf Wuchsstoffe (22) führten wir probeweise folgenden Trennungsgang durch. Gesunde Pflanzen wurden im gefrorenen Zustand im Mixer unter Aceton zerkleinert. Dem Pflanzenbrei wurde weiteres Aceton und destilliertes Wasser zugesetzt, sodaß das Verhältnis Aceton zu Wasser 2:1 betrug. Dieser Ansatz wurde im Kühlschrank bei 4-6°C 36 Stunden extrahiert. Danach wurde das Extraktionsmittel erneuert und nochmals 24 Stunden extrahiert. Die vereinigten Auszüge wurden eingeengt, filtriert, angesäuert und mit Essigester ausgeschüttelt. Die Essigesterlösung schüttelten wir mit Phosphatpuffer vom pH 6,2 aus, säuerten diesen wieder an (pH 2,7) und schüttelten erneut mit Essigester aus. Die hellgelb gefärbte Lösung wurde durch Ausfrieren vom darin enthaltenen Wasser befreit und zur Trockene gebracht. Das folgende Trennschema 1 zeigt die einzelnen Stufen:

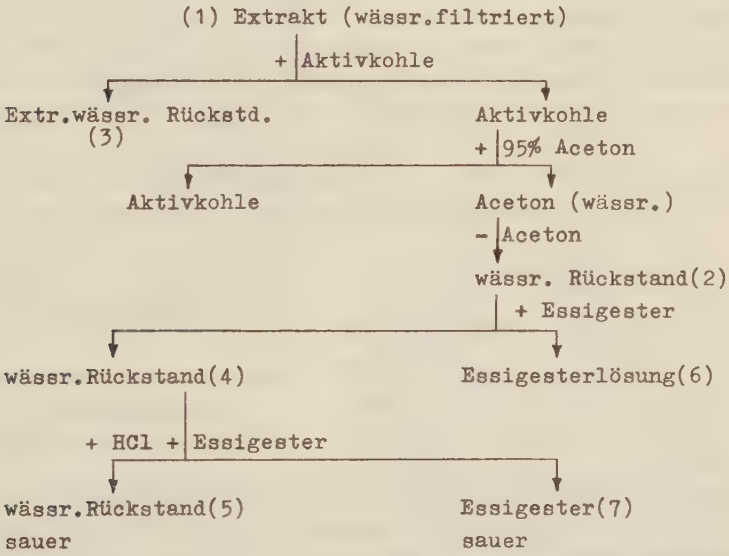


Verschiedene Stufen der Trennung wurden getestet. Es erwies sich als zweckmäßig, die Konzentration nicht nur auf das jeweilige Volumen der Lösung zu beziehen, sondern einen Teil derselben zur Trockene einzudampfen und die Konzentration darauf zu berechnen. Die tabellarische Zusammenstellung der getesteten Lösungen enthält zunächst noch beide Angaben (Tab. 8). Es sollte festgestellt werden, welche biologische Aktivität diejenigen Fraktionen des Trennungsganges noch zeigen, die nicht mehr weiterverarbeitet werden. Aus der Tabelle sieht man, daß hier zunächst eine Aufspaltung der aktiven Substanz festzustellen ist, das heißt, mit Essigester läßt sich nicht alles ausschütteln. Aus der Essigesterlösung geht wiederum nur ein Teil der wirksamen Substanz in den Puffer. Die Prüfung des Puffers aber zeigte deutlich einen anderen Anstieg bei fallender Konzentration als alle anderen Fraktionen. Diese Tatsache wurde von uns genauer nachgeprüft. Das Ergebnis war, daß der Puffer selbst schon hemmend wirkt. Aus diesem Grunde ist eine Verwendung von Phosphatpuffer im Trennungsgang unzuläßig. Wir stehen mit diesem

Fraktion	conc. mg/ml	Keimung %	Vol.conc.
	22,3	0	10^{-4}
(1)	2,23	87	10^{-5}
	0,223	100	10^{-6}
	17,3	1	$2 \cdot 10^{-4}$
(2)	1,73	89	$2 \cdot 10^{-5}$
	0,173	103	$2 \cdot 10^{-6}$
	1,67	12	$2 \cdot 10^{-4}$
(5)	0,167	103	$2 \cdot 10^{-5}$
	0,042	104	$5 \cdot 10^{-6}$
		1	10^{-4}
(7)		38	10^{-5}
		71	$2{,}5 \cdot 10^{-6}$
	5,5	23	10^{-2}
(8)	0,55	102	10^{-3}
	0,055	103	10^{-4}
	2,07	26	$2 \cdot 10^{-4}$
(9)	0,207	88	$2 \cdot 10^{-5}$
	0,072	102	10^{-5}

Tabelle 8

Untersuchungsergebnis im Einklang mit Literaturangaben über die Einwirkung des pH-Werts und von Puffersubstanzen beim Hemmstofftest (14).
Unsere bisherigen Ergebnisse zeigten, daß der Trennungsgang, wie wir ihn für die versuchte präparative Isolierung von Wuchsstoffen angewandt hatten, auch für die Inhibitoren am günstigsten war. Extraktion mit Aceton/Wasser 2:1, anschließende Adsorption der Wirkstoffe an Aktivkohle und Celit+ aus wässrigem Medium und Desorption mit 95%igem Aceton bringt eine gute Vorfraktionierung. Nachdem aus dem Desorbat das Aceton abgezogen ist, kann man direkt mit Essigester ausschütteln. Das Trennschema 2 ist also Folgendes:



Der Biotest der verschiedenen Fraktionen (Tab.9) zeigt, daß auch hier die Trennung noch nicht vollständig ist, doch ist sie besser als bei allen vorherigen Verfahren. Bei der Behandlung der Extrakte mit Aktivkohle wird offenbar nicht die gesamte wirksame Substanz adsorbiert. Wir haben die Fraktion(3) in einer gesonderten Trennung deshalb

+Dargo G 60 und Hyflo Super Celit, Fa.Serva,Heidelberg

weiteruntersucht (siehe Kapitel 11).
Der Unterschied des Trennungsgangs bei Verwendung von Aktivkohle und Celit einerseits und Pufferlösung andererseits zeigt sich auch am Hemmstoffgehalt der aus Essigester gewonnenen Rückstände.

Frakt.	conc. mg/ml	Keimung %	Vol. conc.
	35,30	2	$2 \cdot 10^{-5}$
(1)	1,765	66	10^{-6}
	0,176	100	10^{-7}
	21,90	10	$2 \cdot 10^{-4}$
(2)	1,095	13	10^{-5}
	0,109	103	10^{-6}
	33,50	1	$2 \cdot 10^{-5}$
(3)	1,675	81	10^{-6}
	0,167	102	10^{-7}
	13,80	9	$2 \cdot 10^{-4}$
(4)	0,69	81	10^{-5}
	0,069	102	10^{-6}
	9,68	77	$2 \cdot 10^{-4}$
(5)	0,484	84	10^{-5}
	0,048	110	10^{-6}

Tabelle 9

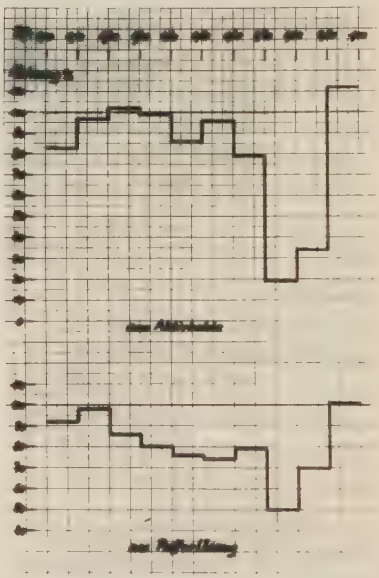


Abb.6 Biotest der versch. Rohsubstanzen (chromatografiert)

Zur Überprüfung setzten wir je ein Chromatogramm mit Substanz, welche nach der einen und nach der anderen Methode gewonnen worden war, an. Es wurden jeweils gleiche Mengen verwendet. Nach dem Entwickeln der Chromatogramme ergab der Biotest die in der Abb.6 dargestellten Kurvenzüge. Die Bilder beweisen deutlich, daß der Trennungsgang mit Aktivkohle wirkungsvoller ist.

7. Weiterentwicklung der Trennung

Bei einer 30stufigen Craigschen Verteilung, die wir früher durchgeführt hatten, war die Hemmsubstanz in den Fraktionen 26-30 angereichert worden. Als Oberphase war dabei Essigester Benzol 10/2 verwendet worden, die Unterphase bildete Wasser. Wir verteilten also nochmals Substanz aus dem Essigesterrückstand in einer 25 stufigen Apparatur. Die einzelnen Fraktionen wurden dünnschichtchromatographisch untersucht und zu drei Hauptgruppen zusammengefaßt. Die vereinigten Fraktionen von 17-25 waren mohnaktiv. Durch fraktioniertes Lösen derselben mit Petroläther, Chloroform, Essigester und Aceton/Äthanol ergab sich, daß die biologische Wirksamkeit im Chloroformauszug verblieb. Es ließen sich jedoch in ihm noch eine ganze Anzahl von Flecken chromatographisch feststellen. Die Erkenntnis, daß sich die Hemmstoffe in Chloroform lösen, machten wir uns zu Nutze. Wir umgingen die Craigverteilung und extrahierten den trockenen Rückstand aus dem Essigester sofort im Soxhlet mit Chloroform.
Der Test bestätigte uns, daß die weitere Auftrennung so mit gutem Wirkungsgrad durchgeführt werden kann (Tab.10).

Fraktion	%Keimung
$CHCl_3$ Eluat	17
Rückstand (in Äthanol gelöst)	94

Tabelle 10

Ein Papierchromatogramm der Chloroformfraktion ergab beim Biotest die Abb.7. Die im UV-Licht sichtbaren Farben sind zum Vergleich mit angezeichnet.

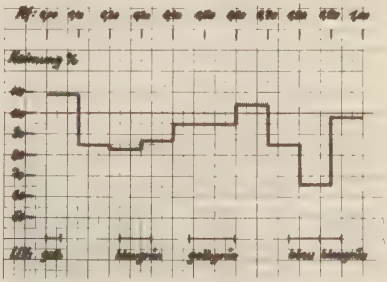


Abb.7 Biotest der Chloroformfraktion (chromatografisch getrennt)

Wir führten zur Kontrolle mit 100 mg der aus dem Chloroformeluat erhaltenen Substanz eine 30stufige Craigverteilung in Essigester Benzol/Wasser 10:2/10 aus und teste-

ten verschiedene Fraktionen biologisch. In der Abbildung 8 ist die in den einzelnen Stufen vorhandene Substanzmenge, zugleich aber auch die zugehörige Hemmwirkung aufgetragen. Zur Lösung der Rückstände in den Einzelfraktionen wurde dabei immer die gleiche Menge Lösungsmittel verwendet, sodaß man auch die Zunahme der Hemmung mit steigender Konzentration im Diagramm erkennen kann.

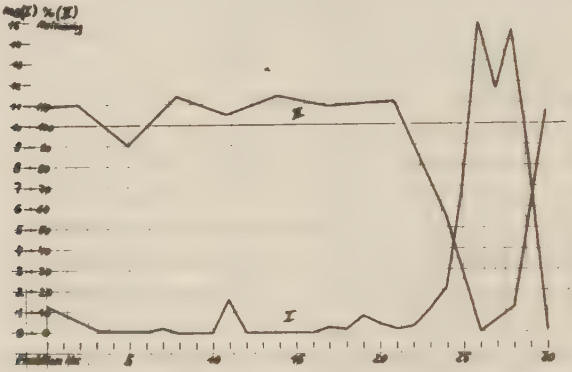


Abb.8 Auswaage und Biotest der Craigverteilung I = Substanzmenge in mg
II = %Keimung

Die durch Chloroform extrahierbaren Substanzen lassen sich, wie man aus der Abbildung sieht, im verwendeten System nicht weiter auftrennen.

Die Dünnschichtchromatographie auf Cellulose, welche der Papierchromatographie völlig analog ist, ergab für unsere aus Chloroform erhaltene Substanz folgendes Bild: Beim Entwickeln der Platten mit destilliertem Wasser kam es zur Ausbildung verschiedener Zonen. Diese teilten sich wie in Tabelle 11 dargestellt auf. Sie wurden abgeschabt und in einem Mikroelutionsrohr mit Aceton und Methanol extrahiert. Die auf diese Weise gewonnenen Fraktionen wurden erneut im gleichen System chromatographiert. Das Ergebnis veranschaulicht Abbildung 9.

Zone	Rf - Wert
1	0,90 - 1,00
2	0,60 - 0,90
3	0,37 - 0,60
4	0,24 - 0,37
5	0,05 - 0,24
6	Start

Tabelle 11

Abb.9 Chromatogramm der Zonen 1 - 6

Neben der Prüfung der Zonen auf chromatographischem Weg führten wir auch den Papavertest durch. Er ergab die nachstehend in Tabelle 12 aufgeführten Hemmwerte. Vergleicht man diese mit dem Chromatogramm, so zeigt sich, daß die wirksame Substanz in einem Rf-Wertbereich von ca. 0,70 - 0,85 vorhanden ist, das heißt, in Zone 2 tritt optimale Hemmung auf. Die Wirkung in Zone 3 ist auf nicht vollständige Trennung der Ausgangskomponenten zurückzuführen. Auch am Start ist noch etwas von dem Wirkstoff zurückgeblieben.

Zone	% Keimung
1	96
2	33
3	41
4	83
5	82
6	49

Tabelle 12

Versuche, die Trennung der Wirkstoffe auf einer Cellulosesäule durchzuführen, mußten aufgegeben werden, da sich zu viele Nebenbestandteile aus dem Säulenfüllmaterial in den Rückständen der einzelnen Fraktionen fanden. Bei Versuchen mit Aluminiumoxid sowohl auf DS -Platten als auch in Säulen konnten die Substanzen erst mit Aceton oder Methanol zum Laufen gebracht werden.
Auf Kieselgelplatten ließen sich die Substanzen mit Chloroform entwickeln, doch war der Rf-Wert sehr niedrig.

Ein Zusatz von geringen Mengen Methanol oder Äthanol verbesserte die Trennung. Wir führten deshalb zunächst eine Trennung der Komponenten in einer Kieselgelsäule+ durch, wobei zuerst mit reinem Chloroform eluiert wurde. Als sich damit keine Substanz mehr vom Kopf der Säule löste, wurde dem Chloroform stufenweise Methanol zugesetzt. Zuletzt gaben wir zu dem reinen Methanol noch etwas Eisessig, um alle Substanzreste aus der Säule zu entfernen. Die einzelnen Eluate dampften wir im Stickstoffstrom auf dem Wasserbad ein. Sämtliche Fraktionen wurden biologisch getestet. Die Abbildung 10 zeigt das Resultat des Versuchs.

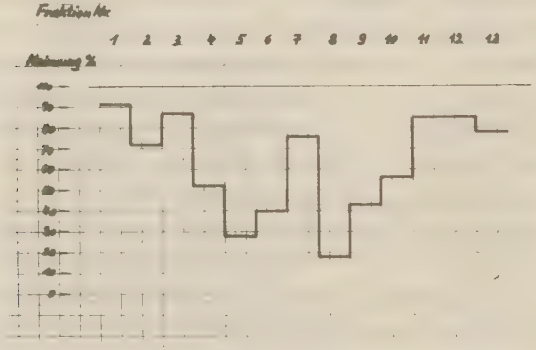


Abb.10 Biotest der Säulentrennung

Bei Fraktion 5 und 8 treten Hemmungsmaxima auf. Die wirksamsten Fraktionen trennten wir auf Mikrokieselgelsäulen noch weiter auf. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 13 zusammengestellt. Die Konzentrationen in mg/ml wurden erst später berechnet. UV - spektroskopische Untersuchungen bei der Auftrennung der Einzelfraktionen ergaben keine befriedigenden Ergebnisse, weshalb hier auf ihre Wiedergabe verzichtet sei. Die Tabelle 13 zeigt, daß sich alle Fraktionen noch auftrennen ließen, doch bei der dünnschichtchromatographischen Prüfung waren auch diese Unterfraktionen noch nicht rein.

+Kieselgel Merck zur Säulenchromatografie

Ausgangs-wirksamkeit % Keimung	Fraktion/ Zone	Keimung %	conc. mg/ml
72	2/1	103	0,122
	2/2	73	0,018
	2/3	87	0,080
52	4/2	18	
	4/4	86	
28	5/1	104	0,047
	5/2	98	0,122
	5/3	81	0,118
	5/4	53	0,294
	5/5	55	0,270
40	6/1	103	0,017
	6/2	48	0,053
	6/3	79	0,043
	6/4	43	0,322
	6/5	49	0,280
	6/6	83	0,060
18	8/1	94	
	8/2	39	0,150
	8/3	19	0,299
43	9/2	70	0,255
	9/3	75	0,438
	9/4	70	0,650
	9/5	99	0,153
56	10/2	67	1,100
	10/3	90	0,188
	10/4	56	0,632

Tabelle 13

Bei der ersten Trennung der Substanzen auf Kieselgel wurden, von reinem Chloroform als Elutionsmittel ausgehend, diesem in Stufen 5, 10, 20 und 50 Teile Methanol zugesetzt und am Ende mit reinem Methanol eluiert.

Dabei wurde das Sorptionsmilieu sprunghaft stark geändert. Um die damit verbundenen Nachteile zu vermeiden, führten wir die Trennung an Kieselgel noch in einer anderen Weise aus. Nach anfänglichem Entwickeln der Säule mit reinem Chloroform stellten wir einen linearen Gradienten von 0 - 10% Methanol in Chloroform ein und nachdem mit diesem die Hauptmenge der Hemmstoffe aus der Säule gelöst worden war, steigerten wir die Methanolmenge linear von 10 - 100%. In einem Fraktionskollektor wurden 80 Fraktionen aufgefangen. Nach dem Ergebnis der damit durchgeführten, dünnschichtchromatographischen Prüfung auf Cellulose- und auf Kieselgelplatten wurden 18 Sammelfraktionen gebildet. Sie wurden zuerst biologisch getestet (Abb.11).Konzentrationen siehe experimenteller Teil.

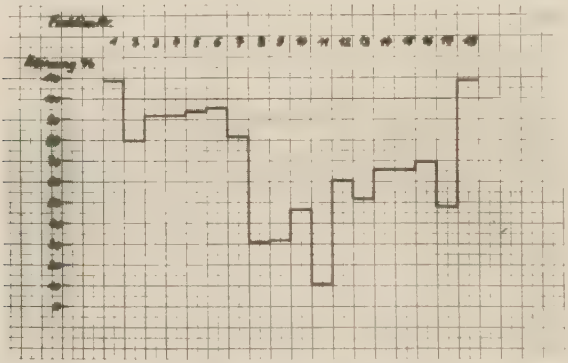


Abb.11 Biotest der Gradientenelution

In einem besonderen Diagramm (Abb.12) sind die Hemmwerte und die Zusammensetzung des Elutionsgemisches gegen die durch die Säule geflossene Menge Lösungsmittel aufgetragen. Man kann dadurch feststellen, bei welcher Zusammensetzung des Elutionsgemisches jeweils aktive Substanz aus der Säule austritt. Aus dem Bild sieht man, daß bei einem Gehalt von 5 - 7% Methanol in Chloroform die aktiven Substanzen im Eluat erscheinen.

Reagens	Fraktion Nr. 2	7	8	11	17
äthan.H_2SO_4	(blau)	(rotbr.)	(grünbl)	grün	blau(UV)
Jod in $CHCl_3$	+	+	+	+	+
$KMnO_4$/Essigsre	gelb	gelb	gelb	gelb	gelb
TTC	braunrot	(rötl.)	(rötl.)	(rötl.)	braunrot
Bromphenolblau	-	-	(schw.bl)	-	blau
„ (pH 8,5)	-	-	(gelbl)	(gelbl)	(gelbl)
Rhodamin B(UV) (sichtbar)	blau weiß	rot weiß	bräunl. weiß	violbl. weiß	violbl. weiß
$FeCl_3$ 0,1% in Methanol	-	-	-	-	grau
$FeCl_3$ + $K_3Fe(CN)_6$	blau	(schw.bl)	(schw.bl)	blau	blau
KOH methanol.	blau	(schw.bl)	(schw.bl)	blau	blau(UV)
2,4-DNPH	-	-	-	-	-
Phosphorsäure 3n	blau	rötl.	grün	grün	blau(UV)
p-Dimethylaminobenzaldehyd	-	-	-	-	-
Ninhydrin	-	-	-	-	-
Fuchsinschwefl.Sre	-	-	-	-	rotviol.
Anilinphthalat	-	-	-	-	-
N-BrSuccinimid-Fluorescein	-	-	-	-	-
4-Methylumbelliferon	-	-	-	-	-
Phosphormolybdänsäure	blaugrau	blaugrau	blaugrau	blaugrau	blaugrau

Tabelle 14

Zur Identifizierung wurden Proben der besonders wirksamen Fraktionen und zwar jeweils die Hälfte der zum Biotest verwendeten Menge, auf Chromatographiepapier aufgetragen und mit verschiedenen Sprühreagenzien behandelt. Eine Zusammenstellung über diese Versuche gibt die Tabelle 14.

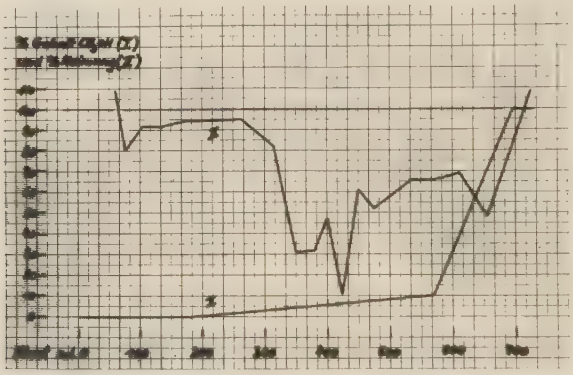


Abb.12 Biotest in Abhängigkeit vom Eluat

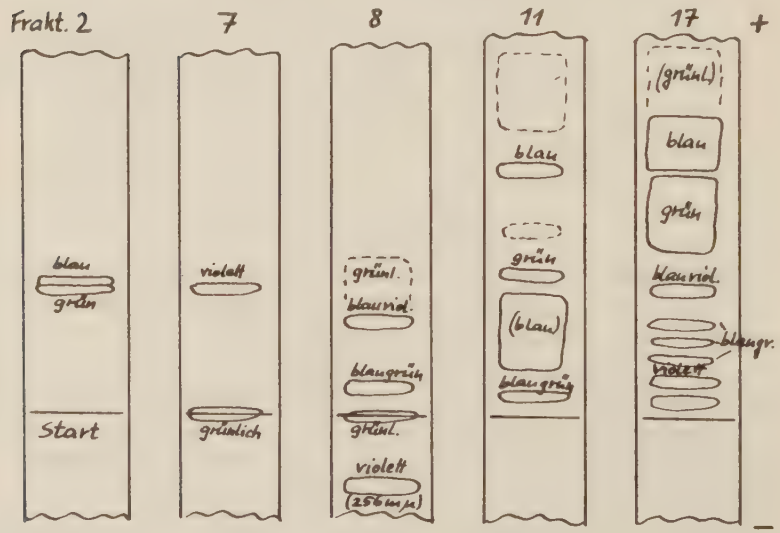


Abb.13 Elektrophorese in Na-citrat

Mit denselben Fraktionen führten wir auch elektrophoretische Untersuchungen durch. In verschiedenen Pufferlösungen ließ sich noch eine weitere Auftrennung erzielen. Die Substanzen wurden jeweils in der Mitte des Papierstreifens aufgebracht. In einem Natriumcitratpuffer vom pH-Wert 12 ergab sich die in Abb.13 gezeigte Trennung. Mit sekundärem Natriumphosphat als Puffer (pH 8,5) sieht die Trennung etwas anders aus (Abb.14).

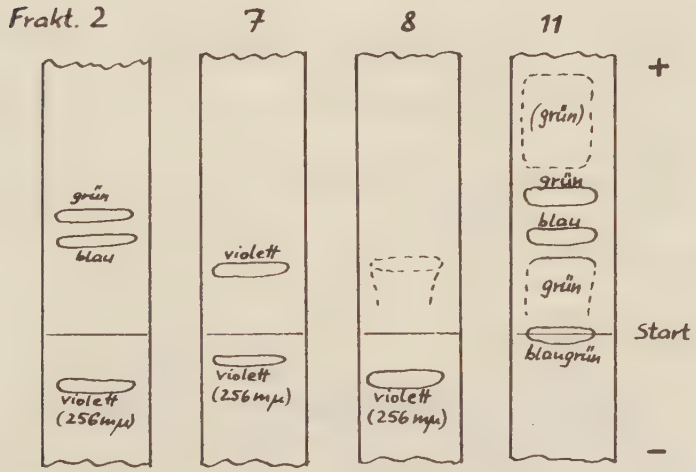


Abb.14 Elektrophorese in sek. Na-phosphat

Da wir nach der papierelektrophoretischen Trennung bei einigen Zonen auch den Biotest ausführen wollten, nahmen wir hierfür 0,2 n Ammoniak (pH 11,2) als Elektrolyt, da er nach erfolgter Elektrophorese rückstandsfrei entfernt werden kann. Die Fraktionen 2, 7 und 8 wurden auf diese Weise getrennt und die Papierstreifen mit verschiedenen Sprühreagenzien behandelt. In der Tabelle 15 sind die Reaktionen zusammengestellt.

Sprühreagenz	Fraktion Nr. 2	7	8
TTC	Start +	-	2,7-3,0cm -Pol rot
2,4-DNPH	-	-	-
Phosphor-molybdän-säure	a)Start bis 1,2 cm zum +Pol graublau b)1,6 cm -Pol graublau	Start +	a)1,0-3,5 cm +Pol blau-grau b)2,0-3,0 cm -Pol bl.grau
$FeCl_3$+ $Fe(CN)_6K_3$	a)Start blau b)4,0 cm+Pol blau	1,9 cm -Pol blau	
Jod in $CHCl_3$		-	3,0 cm-Pol braun
UV-Licht	4,0 cm+Pol grünblau	3,4 cm-Pol viol.(256mμ)	3,0 cm-Pol viol.256mμ

Tabelle 15

Wie diese Versuche zeigen, sind die untersuchten Fraktionen noch nicht rein. In den stark hemmungsaktiven Fraktionen finden sich noch immer mehrere Substanzen. In einem besonderen Fall führten wir die Untersuchungen noch weiter. Die Fraktion 8, die schon relativ rein zu sein schien, wurde insgesamt in 0,2 n Ammoniak als Puffer elektrophoretisch getrennt. Die im kurzwelligen UV-Licht (256 mμ) sichtbare Zone wurde ausgeschnitten und eluiert. Um für die folgende UV-spektroskopische Messung einen geeigneten Vergleich zu bekommen, schnitten wir aus demselben Papierbogen ein der Zonengröße entsprechendes Stück aus und eluierten es analog. Gegen dieses Eluat gemessen ergab sich das UV-Spektrum der Abbildung 15. Da das Molekulargewicht nicht bekannt ist, können die ε-Werte nicht angegeben werden. Das Eluat der Substanzzone wurde auf seine Hemmwirkung geprüft. Die Keimung beträgt nur 58% der Kontrollen. Die wässrige Lösung des Stoffes ließen wir auf Ciliaten einwirken. Nach 40 Min.

waren alle Tiere noch am Leben. Der Hemmstoff ist also nicht toxisch.

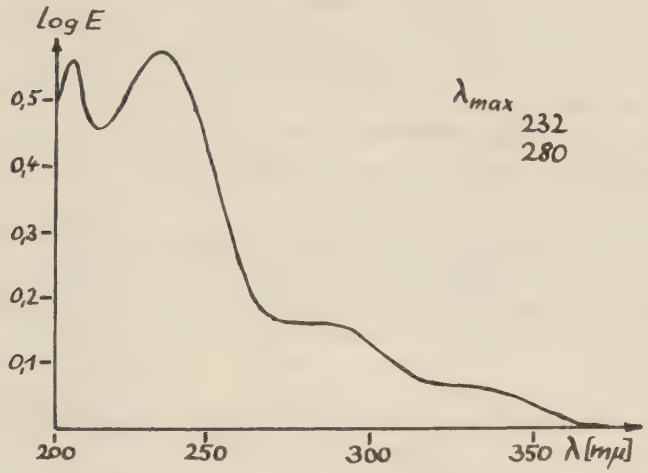


Abb.15 UV Spektrum von Fraktion 8 nach der Elektrophorese (aufgenommen mit Gerät Beckman DB, 1cm Küvetten. Lösungsmittel Methanol p.a.Merck, conc. ca.25 µg/ml)

An diesem Beispiel kann gezeigt werden, daß die Hemmwirkung von einem einzigen Stoff ausgeht. Es ist aber möglich, daß mehrere Inhibitoren in den einzelnen Fraktionen der Säulentrennung vorhanden sind, deren Einzelwirkung sich summiert. Wir haben dies nicht näher untersucht.

8. Versuche zur präparativen Isolierung von Hemmstoff

Bisher hatten wir die auftretende Hemmwirkung von Stufe zu Stufe verfolgt und waren durch Einsatz verschiedenster analytischer Verfahren zu einer Substanz gekommen, die hemmend wirkt. Dabei waren andere wirksame Fraktionen nicht mehr weiter verfolgt worden. Auf den gewonnenen Erfahrungen aufbauend, sollte nun eine Aufarbeitung von großen Pflanzenmengen eine wägbare Menge Hemmsubstanz

ergeben. Wir setzten dafür 32 kg gesunde Euphorbien, die wir im Frühjahr 1963 gesammelt und in der Tiefkühltruhe bei ca. - 18°C eingelagert hatten, ein. Die Zerkleinerung erfolgte wieder im Mixer unter Aceton. Die zerkleinerten Pflanzen wurden nach dem schon angegebenen Schema 2 mit Aceton Wasser 2:1 extrahiert und weiterverarbeitet (Einzelheiten siehe experimenteller Teil). Die gesamte Aufarbeitung prüften wir in den wichtigsten Stufen mittels des Mohntests(Tab. 16 und 17).

Fraktion	conc. mg/ml	Keimung %	Vol.conc.
	35,30	2	$2 \cdot 10^{-5}$
(1)	1,765	66	10^{-6}
	0,176	100	10^{-7}
	21,90	10	$2 \cdot 10^{-4}$
(2)	1,095	13	10^{-5}
	0,109	103	10^{-6}
	33,50	1	$2 \cdot 10^{-5}$
(3)	1,675	81	10^{-6}
	0,167	102	10^{-7}
	13,80	9	$2 \cdot 10^{-4}$
(4)	0,690	81	10^{-5}
	0,069	102	10^{-6}
	9,68	77	$2 \cdot 10^{-4}$
(5)	0,484	84	10^{-5}
	0,048	110	10^{-6}

Tabelle 16

Der Rückstand aus dem direkten Essigesterauszug (Rohsubstanz) wurde nach dem Trocknen im Soxhletapparat mit Chloroform behandelt. Aus verschiedenen Gründen trennten wir die Rohsubstanz nicht auf einer Kieselgelsäule weiter auf, sondern setzten die multiplikative Verteilung dafür ein. Die Substanz wurde einer 26 stufigen Craigverteilung im System

Methanol Wasser/Tetrachlorkohlenstoff Chloroform 5:5/4:1 unterworfen. Dabei traten zwei Substanzmaxima in der 3. und 25. Stufe der Verteilung auf.

Fraktion	nach	24h % Keimung bei conc. mg/ml			44h	
	10	1	0,1	10	1	0,1
Chloroformeluat aus Essigester (6)	29	37	93	22	75	101
Rückstand von (6)	18	98	85	44	103	95
Chloroformeluat aus dem angesäuerten Essigester(7)	60	37	90	45	90	93
Rückstand von (7)	40	111	105	92	125	106

Tabelle 17

Der Mohntest, bei dem alle geprüften Fraktionen eine Konzentration von 500 µg/ml hatten, zeigte ein interessantes Ergebnis (Abb.16):

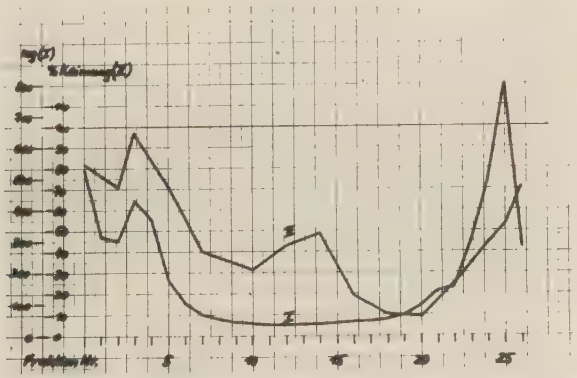


Abb.16 Auswaage in mg(I) und Keimung in %(II)

Die Anreicherung der Wirkstoffe geschieht nicht gleichlaufend mit den Substanzmaxima , sondern ist dagegen versetzt. Wir haben eine Reihe von Fraktionen, welche wenig Substanz hoher Hemmwirkung enthalten und solche, die trotz hoher Gesamtsubstanzmenge nur einen Bruchteil der Wirkstoffe enthalten. Dies war für die weitere Aufarbeitung ein großer Vorteil.
Auf eine ca. 1 mm dicke, mit Cellulose (MN 300)+ beschichtete Dünnschichtplatte, trugen wir die gesamte Substanz der Fraktion 16 der Craigverteilung (44 mg) in einem Gemisch von Chloroform und Methanol 1:1 gelöst, auf und entwickelten die Platte wie gewöhnlich in destilliertem Wasser. Unter der UV-Lampe zeigten sich 5 Zonen, die in Tabelle 18 dargestellt sind.

Zone	Rf - Wert	Farbe
Start		braun sichtb.
1	0,10 - 0,30	blau UV
2	0,30 - 0,48	grün
3	0,70 - 0,76	blaugrün
4	0,80 - 0,90	viol.(256mμ)
5	0,90 - 0,96	(blaugrün)

Tabelle 18

Die Platte wurde in 10 Abschnitte zu je 0,10 Rf-Werteinheiten aufgeteilt, die so gebildeten Zonen abgeschabt und in Mikroelutionsrohren mit einem Gemisch von Chloroform und Methanol 1 : 1 eluiert. Die Extrakte wurden unter Stickstoff eingedampft und der Rückstand gewogen. Die Hauptmenge der Substanz war am Start geblieben. Nun stellten wir unter Verwendung des erwähnten Lösungsmittelgemisches Lösungen der zehn Zonen her und prüften diese im Mohntest bei einer Konzentration von 100 μg/ml. Das Bild 17 zeigt das Testergebnis.
Die Fraktionen 15 und 17 - 22 der Craigverteilung, die die Hauptmenge an Hemmstoff enthielten, trennten wir ebenfalls in der beschriebenen Weise mikropräparativ auf.

+Macherey und Nagel,Düren.

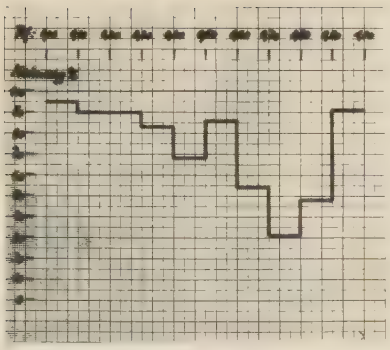


Abb.17 Biotest von Fraktion 16

Eine Dünnschichtplatte konnte dabei mit bis zu 60 mg Substanz belastet werden, ohne daß dabei die Trennschärfe beeinträchtigt wurde. Die Zonen lagen dabei alle genauso wie bei Fraktion 16. Aus diesem Grund vereinigten wir die jeweils gleichen Rf-Werten entsprechenden Zonen. Zur Elution wurde die abgeschabte Schicht in kleine Chromatographierohre mit Hahn eingefüllt. Nacheinander eluierten wir mit Äther, Chloroform, Aceton und Methanol.

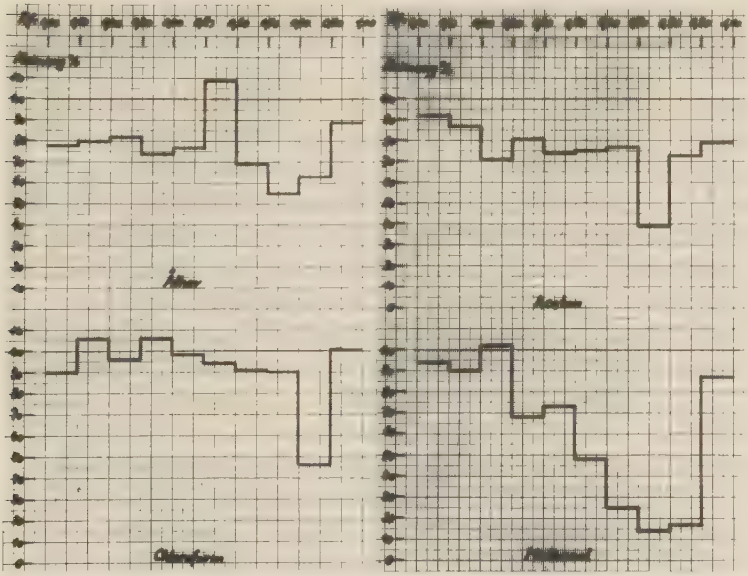


Abb. 18 u.19 Biotest der vier verschiedenen Eluate

So ergaben sich 40 verschiedene Fraktionen, die nach dem Abdampfen des Lösungsmittels ausgewogen wurden.

Für den Mohntest lösten wir mit dem jeweils zu Elution verwendeten Lösungsmittel die Substanzen wieder auf und prüften sie in einer Konzentration von 100 µg/ml. Dabei wird die verschiedene Löslichkeit der Substanzen also mitberücksichtigt (Abb.18 und 19). Die vier verschiedenen Kurven zeigen augenfällig, daß die Hauptmenge an wirksamen Stoffen erst mit Methanol wieder völlig abgelöst wird. Jede Kurve hat jedoch ihr Minimum an derselben Stelle. Die oben angegebene Konzentration bezieht sich auf das jeweilige Gemisch, es ist aber aus den Kurven klar zu ersehen, daß der Anteil an Hemmstoff in den verschiedenen Zonen unterschiedlich ist, das heißt mit anderen Worten, die Trennung auf der Dünnschicht ergibt eine Anreicherung der Hemmstoffe im Bereich vom Rf-Wert 0,70 - 0,80. Wir prüften deshalb die Zonen 7-10 (Rf-Wert 0,60 - 1.00) der Abbildungen 18 und 19 und diejenigen von Fraktion 16 (Abb.17) mit verschiedenen Sprühreagenzien auf Kieselgelplatten.

Platte 1

Zuerst wurde mit einer Lösung von Jod in Chloroform gesprüht. Bei allen aufgetragenen Flecken zeigte sich eine mehr oder weniger starke Braunfärbung. Durch erhitzen vertrieben wir das Jod und sprühten mit Schwefelsäure. Die Betrachtung im UV - Licht zeigte keine Fluoreszenzen. Nachfolgendes besprühen mit Chromschwefelsäure und anschließendes erhitzen ergab bei allen Flecken Schwarzfärbung. Die mit Äther und Methanol abgelösten Substanzen waren besonders stark verkohlt.

Platte 2

Besprühen der Flecken mit methanolischer Kalilauge ergab im UV - Licht keine Fluoreszenz. Auf die alkalische Schicht wurde Bromphenolblau in Äthanol aufgesprüht. Auf blauvioletten Grund zeigten sich grüne Flecken.

Platte 3

Eine 1%ige wässrige Eisen-III-chloridlösung gibt bei Zone 9 der in Aceton und Methanol löslichen Substanz rötliche Färbung. Beim Nachsprühen mit Kaliumferricyanid

färben sich Zone 7 und 8 des Ätherlöslichen und die Zonen 7, 8 und 9 des Methanollöslichen blau.

Platte 4

Mit 0,1% 2,6 - Dichlorphenolindophenol in Äthanol zeigen Zone 7 und 8 Ätherlöslich und Zone 7 - 10 Methanollöslich starke Rotfärbung, die übrigen Flecken sind nur ganz schwach zu sehen.

Platte 5

Essigsaure Kaliumpermanganatlösung ergibt bei Zone 7-10 Ätherlöslich und 7 - 10 Methanollöslich stark gelbe Flecke auf rosa Grund.

Die Substanzen der Zonen 8 und 9 des Methanollöslichen chromatographierten wir auf Celluloseschichten nochmals. Die Zone 8 ergab zwei im UV - Licht fluoreszierende Flecke, die Zone 9 einen. Die Rf-Werte waren 0,20 (sehr schwach) und 0,80 für Zone 8, 0,80 für Zone 9.Die Flecke reagieren nicht mit 2,4- Dinitrophenylhydrazin. Positive Reaktionen erhält man mit Jod in Chloroform, Eisen-III-chlorid + Kaliumferricyanid und mit Phosphormolybdänsäure. Mit der Substanz aus Zone 8 des Methanoleluats stellten wir verschiedene Versuche zur Löslichkeit der wirksamen Komponenten an. Die Substanz wurde mit Äther, Chloroform, Aceton und Methanol bei Raumtemperatur in der genannten Reihenfolge versetzt, das Lösungsmittel abgegossen und eingedampft. Der Äther löst 70% der Substanz; aus dem Rückstand gehen 10% in Chloroform, die restlichen 20% löst erst das Methanol. Da angenommen werden muß, daß die Hemmstoffe natürlich in wässriger Lösung vorliegen, wurden die Rückstände der erhaltenen drei Fraktionen mit destiliertem Wasser behandelt. Dabei gingen aus der Ätherfraktion 44%, aus der Methanolfraktion 95% und aus der Chloroformfraktion 5% in Wasser. Ein mit den verschiedenen Lösungen durchgeführter Mohntest ergab bei einer Konzentration von 100 µg/ml die in Tabelle 19 aufgeführten Werte. Daraus ist zu ersehen, daß tatsächlich die aus dem Ätherlöslichen in Wasser gegangene Substanz am wirksamsten ist.

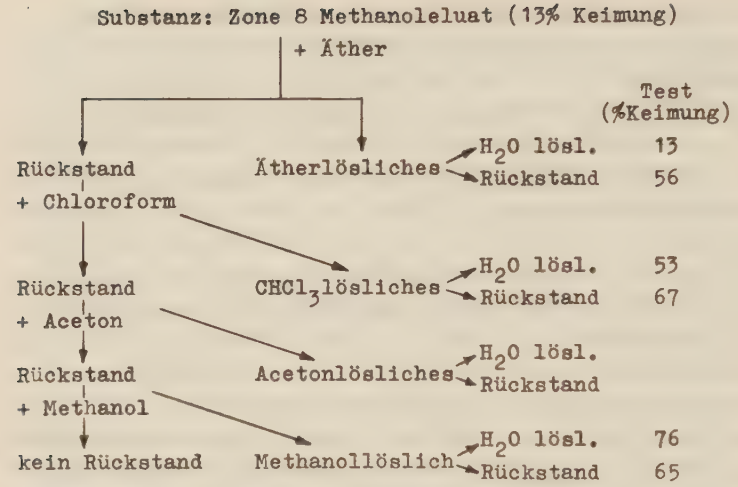


Tabelle 19

Mit der Substanz aus Zone 9 des Methanoleluats führten wir folgendes aus (Tab.20):

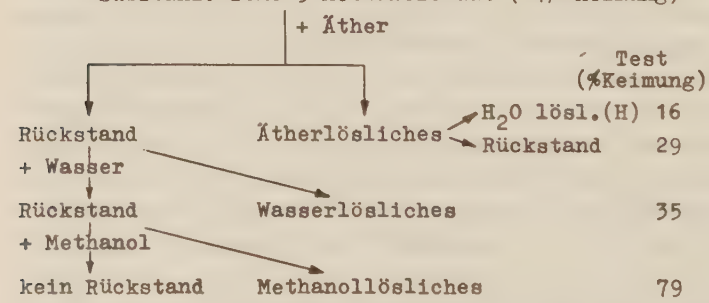


Tabelle 20

Hier war die Trennung schlechter. Im Ätherlöslichen verblieb noch wirksame Substanz. Die Tabelle zeigt, daß auch direkt mit Wasser Hemmstoff aus der Zone 9 gelöst werden kann. Die Konzentration an Wirkstoff in den einzelnen Fraktionen muß hier schon beträchtlich

sein; es handelt sich um hochangereicherte Lösungen, möglicherweise sogar schon um den Reinstoff. Die Prüfung der Fraktion: Wasserlöslich aus Ätherlöslichem (H) in drei Konzentrationen ergab die folgende Abstufung (Tab.21).

Konzentration µg/ml	Keimung %
100	16
10	68
1	88

Tabelle 21

9. Versuche zur Klassifizierung der Hemmsubstanz

Der Inhibitor enthält Kohlenstoff, Wasserstoff und Sauerstoff. Stickstoff und Schwefel konnten nicht nachgewiesen werden. Der Nachweis alkoholischer Gruppen war negativ. Durch verschiedene Reaktionen konnte eine Ketogruppe, die in der Anordnung $-CH_2-CO-CH_2-$ vorliegen muss, festgestellt werden, obwohl die Substanz nicht mit 2,4 - Dinitrophenylhydrazin reagiert. Die Ketogruppe kann anscheinend leicht enolisieren, da zahlreiche Reaktionen, die von Enolen gegeben werden, positiv ausfallen. Der Hemmstoff reagiert positiv bei der Prüfung auf Doppelbindungen.
Es läßt sich eine Säuregruppe nachweisen. Die Substanz bewegt sich bei der Elektrophorese in 0,2 n Ammoniak als Elektrolyt zur Kathode und verhält sich hierbei wie die schon beschriebene Fraktion 8 aus der Säulentrennung. Es wandert nur eine Zone, die sich im kurzwelligen UV-Licht (256 mµ) als violetter Streifen nachweisen läßt.
Das UV-Spektrum zeigt Maxima bei λ_{max} = 205, 230, 275 mµ. Es zeigt Übereinstimmung mit demjenigen der Abbildung 15. Soweit man das IR-Spektrum des Hemmstoffs (Abb.20) auswerten kann (1) ist die Substanz aliphatischer Natur. Die C=O-Valenzschwingung ist stark ausgeprägt und liegt bei 1700 cm^{-1}. In ihr ist noch eine etwas kurzwelligere Bande bei 1712 cm^{-1} zu erkennen, die einer Ketongruppe zugeordnet werden kann. Die noch vorhandenen Banden lassen sich

für die Annahme einer α,ß-ungesättigten Säure zwanglos deuten. Kombiniert man dieses Ergebnis mit dem UV-Spektrum, so kann man die Maxima bei 205 und 230 mμ der Säure, das bei 275 mμ dem Keton zuordnen.
Die Hemmsubstanz stimmt in vielen Eigenschaften mit dem in der Literatur beschriebenen ß-Inhibitor (32) überein.

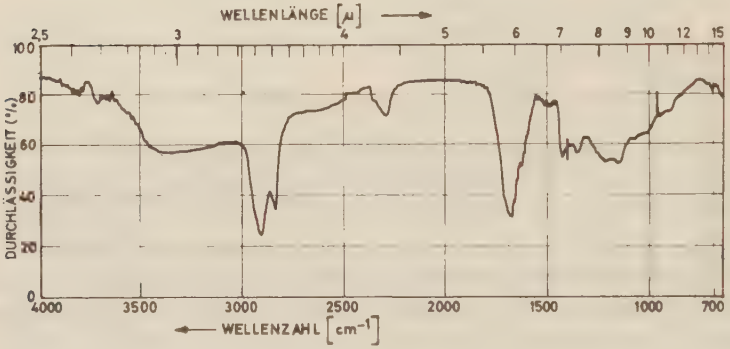


Abb.20 IR-Spektrum des Hemmstoffs (aufgenommen mit Gerät PE 221 mit Gitter und Mikroilluminator)

10. Quantitative Aufarbeitung von gesunden und befallenen Euphorbien

Auf Grund der bisherigen Ergebnisse mußten wir die Konzentrationsabhängigkeit der Hemmwirkung bei den verschiedenen Extrakten genauer untersuchen. Manche Versuche brachten keine verwertbaren Resultate. Wir hatten immer unsere mehr oder weniger stark ansprechenden Proben beim Biotest als Leitfaden für die Verfolgung der wirksamen Komponenten benutzt. Wir haben dabei erneut überprüft, ob ein Unterschied im Wirkstoffgehalt gesunder und befallener Pflanzen auch bei Hemmstoffen nachweisbar ist. Schon der Weizentest brachte solche Differenzen zutage. Für den Mohntest führten wir eine vollständige Extraktaufarbeitung durch, wobei

genau gleiche Mengen an Ausgangsmaterial verwendet und jeweils gleiche Volumina an Lösungsmittel zugesetzt wurden. Die Aufarbeitungen gingen streng parallel vor sich. Von jeder Stufe der Aufarbeitung wurden Proben entnommen, die zu einem Teil zwecks Bestimmung der Trockenmasse eingedampft, zum anderen aber für den Biotest eingesetzt wurden. Dieser sollte zwei Gesichtspunkte klären: Erstens die Konzentrationsabhängigkeit der Wirkung beim gleichen Extrakt und zweitens die Unterschiede im Hemmstoffgehalt gesunder und kranker Pflanzen.

Die Ergebnisse dieser Versuche lassen sich am besten tabellarisch (Tabelle 22) aufzeigen. Die Konzentration ändert sich jeweils um eine Zehnerpotenz. Die genaue Konzentration errechnet sich aus den Trockengewichten der Extrakte. Die Auswertung der Tabelle 22 ergibt, daß die Wirkung der Extrakte bei Verdünnung auf 10^{-1} und 10^{-2} der Ausgangskonzentration unterschiedlich schnell abnimmt. Feinere Differenzen bestehen zwischen den einzelnen Stufen der Trennung, wobei auffällt, daß sich die Wirkung offenbar zwischen Fraktion 2 und 3 aufteilt, was wir noch genauer untersuchen wollen (Kapitel 11).

Vergleichen wir nicht die Konzentrationsabhängigkeit der Wirkung, sondern bei gleicher Konzentration die Hemmwirkung bei gesunden und infizierten Pflanzen, so sehen wir, daß die Extrakte gesunder Wolfsmilch höhere Hemmungsraten ergeben, als die befallener. Dies deckt sich mit den Ergebnissen aus dem Weizentest und dürfte wohl auf einen unterschiedlichen Gehalt an Hemmstoffen zurückzuführen sein.

Die gesunde Pflanze enthält also vergleichsweise mehr Hemmstoff und weniger Wuchsstoff als die kranke.

Fraktion	conc. mg/ml	Keimung % gesund	befallen
	4,23	28	56
(1)	0,423	80	95
	0,042	91	97
	1,07	14	44
(2)	0,107	87	111
	0,010	100	103
	4,13	12	26
(3)	0,413	95	95
	0,041	91	100
	0,62	105	109
(4)	0,062	112	114
	0,006	117	104
	1,46	24	46
(5)	0,146	93	100
	0,014	87	103
	1,0	21	85
(6)	0,1	98	101
	0,01	98	115
	0,16	92	98
(7)	0,016	112	78
	0,002	101	83

Tabelle 22

11. Auftrennung der nicht an Aktivkohle adsorbierbaren Anteile

In unserem Trennungsgang trat immer eine Aufspaltung der hemmenden Substanzen bei der Behandlung mit Aktivkohle und Celit ein. Die wässrige Lösung war auch nach der Kohlebehandlung noch hemmungsaktiv. Wir trennten diese Lösung noch weiter auf, um den Grund für die vorhandene Hemmung zu finden. Der wässrige Extrakt wurde an einer Polyamid-

säule+, deren Eignung wir in einem analytischen Vorversuch dafür erprobt hatten, chromatographisch aufgetrennt. Polyamid hat wie Aktivkohle den Vorteil, daß man Substanzen aus wässriger Lösung aufgeben kann. Die eluotrope Reihe kehrt sich bei diesem Sorptionsmittel annähernd um, das heißt, die Elutionswirkung steigt von Wasser über Äthanol, Methanol zum Aceton. Dimethylformamid wirkt am stärksten eluierend.

Da die Trennung an Polyamidpulver auf der Ausbildung von Wasserstoffbrücken basiert, ist die Belastbarkeit einer Säule sehr hoch. Wir haben 200 ml 3%igen Extrakt an einer mit 120g Polyamidpulver gefüllten Säule getrennt. Das Sorptionsmilieu wurde stufenweise geändert und zwar von destiliertem Wasser über Methanol zu Methanol/Aceton 1 : 1 und von diesem zu Aceton. Die Eluate sammelten wir in einem Fraktionssammler. Bei der dünnschichtchromatographischen Untersuchung der Fraktionen konnten diese zu den folgenden Hauptfraktionen vereinigt werden:

I. Wässriger Anteil, farblos
II. Wässriger Anteil, in Lösung hellbraun, eingedampft tief dunkelbraun, sirupartiger Geruch
III. Methanol Fraktion, in Lösung braunrot, eingedampft dunkelbraun
IV. Methanol Fraktion, in Lösung hellbraun, eingedampft brauner Rückstand
V. Methanol Fraktion, in Lösung gelbbraun, eingedampft braun, teeartiger Geruch
VI. Methanol Fraktion, in Lösung gelbbraun, eingedampft brauner Rückstand
VII. Methanol - Aceton Fraktion, in Lösung gelblich, eingedampfter Rückstand braun
VIII. Methanol - Aceton Fraktion in Lösung gelblich, eingedampft braun
IX. Aceton Fraktion, in Lösung gelblich, eingedampft braun
X. Aceton Fraktion, in Lösung gelblich, eingedampft braun
XI. Aceton Fraktion, in Lösung gelblich, eingedampft braun

+Polyamid Woelm,Fa.Woelm, Eschwege

Nachdem wir bereits beim analytischen Vorversuch fanden, daß in einer der Methanolfraktionen Hemmstoff enthalten ist, wurden die Fraktionen I - XI in drei verschiedenen Konzentrationen mit dem Mohntest geprüft. Das Ergebnis zeigt die Tabelle 23.

Fraktion	Keimung in % bei conc.		
	1000µg/ml	100µg/ml	10µg/ml
I	86	82	71
II	66	71	67
III	65	74	71
IV	32	57	68
V	51	66	66
VI	54	75	64
VII	20	81	64
VIII	60	83	69
IX	71	80	57
X	57	59	69
XI	61	67	55

Tabelle 23

Man sieht, daß bei Fraktion IV deutlich eine Hemmung auftritt. Auch die Fraktionen V und VI enthalten noch geringe Mengen des Wirkstoffs; dann tritt wieder bei VII und X ein Effekt auf. Diese Sprünge lassen sich durch den Wechsel des Elutionsmittels erklären. Die Ablösung der aktiven Substanz von der Säule erfolgt nur sehr zögernd, dabei werden die Zonen, was sich auch im Testergebnis zeigt, wieder verwaschen. Bei der analytischen Säule war die Trennung besser.
Wir hatten früher postuliert, daß die hemmende Wirkung des bei der Kohlebehandlung zurückbleibenden, wässrigen Extrakts auf dessen Gehalt an Zuckern und Aminosäuren zurückgeführt werden kann. Es ist altbekannt, daß Zuckerlösungen die Keimung hemmen, da sie einen hohen osmotischen Druck besitzen. Die dünnschichtchromatographische

Untersuchung der bei der Trennung an Polyamid erhaltenen Fraktionen belehrte uns aber anders. Die Fraktionen I - VI wurden auf eine Celluloseplatte aufgetragen und mit n-Propanol/Essigester/Wasser 6:1:3 als Laufmittel chromatographiert. Dabei wurden in den Fraktionen II und III je sieben Aminosäuren gefunden, die bei beiden Fraktionen gleich waren. Da eine Hemmwirkung aber erst in Fraktion IV auftrat, konnten Aminosäuren als Hemmstoff ausgeschlossen werden.

In den Fraktionen II - V wurde ein Zucker gefunden. Durch eine als Vergleich mitgelaufene Probe von Glucose und die Übereinstimmung der beiden Rf-Werte wurde er als Glucose identifiziert.

Die stärkste Glucosekonzentration war in den Fraktionen II und III vorhanden. Wäre der Zucker für die stark hemmende Wirkung verantwortlich gewesen, so hätte sie sich bereits bei diesen Fraktionen zeigen müssen. Nachdem die Hemmwirkung aber erst in Fraktion IV auftrat, konnten auch Zucker als Hemmstoff ausgeschlossen werden.

Neben Aminosäuren und Zuckern hatten sich die Fraktionen noch in weitere Bestandteile getrennt, die nur im UV-Licht sichtbar waren. Die Fraktionen IV, V und VI, die alle hemmende Wirkung zeigten, hatten dabei eine gemeinsame Komponente, die im UV-Licht fluoreszierte und die bei Fraktion IV sehr stark, bei den beiden anderen Fraktionen schwächer vorhanden war. Dies entsprach aber genau der Abstufung der hemmenden Wirkung. Wir verglichen den Rf-Wert, der bei 0,90 lag, mit dem Rf-Wert des Hemmstoffs aus der Aufarbeitung des Acetonextrakts von E.cyparissias. Die beiden Rf-Werte stimmten überein.

Die Hemmwirkung des wässrigen Extraktes wird also nicht durch die darin in hohen Konzentrationen enthaltenen Zucker und Aminosäuren hervorgerufen, sondern beruht auf einer nur unvollständigen Adsorption der wirksamen Substanz an die Aktivkohle. Dies muß aus den Versuchsergebnissen geschlossen werden.

EXPERIMENTELLES

1. Sammeln der Pflanzen

Die oberirdischen Teile der Euphorbien wurden dicht über dem Boden abgetrennt, von anhaftenden Nebenbestandteilen (Erde, andere Pflanzen z.B. Gras, usw.) befreit und in Polyäthylenbeutel verpackt. Es wurde streng darauf geachtet, daß gesunde und infizierte Pflanzen voneinander getrennt waren. Die Ausbeute von einem Tag wurde jeweils gewogen und sofort in die Tiefkühltruhe eingelagert. Wir waren bestrebt, möglichst junge Pflanzen zu sammeln.+

2. Zur Durchführung des Tests mit Weizenblattabschnitten(21)

Weizen wird in destilliertem Wasser über Nacht eingeweicht. Am folgenden Tag steckt man die gequollenen Körner mit dem Embryo nach oben auf sterilisierten Verbandmull, der über einen Glaszylinder gespannt ist. Die ganze Anordnung wird in ein Einmachglas gestellt, destilliertes Wasser bis zum Mull aufgefüllt und das Glas durch loses Auflegen des Deckels verschlossen. Nach dreitägigem Bebrüten bei 27°C im Dunkeln sind ca. 4 cm lange, etiolierte Schößlinge gewachsen. Die Blätter haben die Koleoptilen noch nicht durchbrochen. In einem Abstand von 4 mm vom Korn wird ein 4 mm langes Stück mittels paralleler Rasierklingen aus dem Keimling herausgeschnitten und zum Test verwendet. Alle Teste, also Verdünnungsreihen mit Wuchsstoffen und die Prüfung der Chromatogramme führten wir in Petrischalen mit 6 cm Ø aus. Hierbei werden 10-12 cm^2 große Chromatographiepapierstücke, bezw. entsprechende Chromatogrammabschnitte, so um einen halbierten Objektträger gelegt, daß sie beim Einlegen in die Petrischale mit einem Ende zwischen dem Boden der Schale und dem Objektträger, mit dem größeren Flächenteil jedoch auf demselben liegen. Zum Test von Chromatogrammabschnitten gibt man nun 0,5-0,7 ml destilliertes Wasser in die Schale, sodaß das Papier gleichmäßig feucht ist und legt 10 Blattabschnitte auf. Die Schalen werden mit dem Deckel verschlossen und 40 Stunden bei 27°C im Dunkeln bebrütet. Nach dieser

+Für tatkräftige Hilfe beim Pflanzensammeln danke ich besonders meiner Frau.

Zeit mißt man die Länge der Blattabschnitte unter einem Binokularmikroskop mit Mikrometerskala aus. Es werden jeweils 4 Schalen parallel getestet, die Meßwerte gemittelt und mit dem Mittelwert entsprechender Kontrollen verglichen.

3. Zum Biotest mit Kresse(Lepidium)- und mit Mohn(Papaver)-samen

Beim Lepidiumkeimungstest von Libbert (13) werden 100 Lepidiumsamen (vorjährige Ernte) in Petrischalen von 8 cm Ø auf 16 g Quarzsand, der mit 5 ml der zu untersuchenden Lösung getränkt wird, zur Keimung im Dunkeln bei 27°C ausgelegt. Die gekeimten Samen (Keimung = erstes Sichtbarwerden der Keimwurzel) werden nach etwa 16 Stunden zum ersten Mal, nach 24 Stunden zum zweiten Mal und nach 48 Stunden zum dritten Mal ausgezählt. Das Verfahren erfordert relativ hohe Mengen an Substanz, da sehr viel Lösung notwendig ist.

Beim Keimungstest mit Mohnsamen dagegen sind nur 0,5-0,7 ml Lösung pro Schale erforderlich. Außerdem kann man auch nichtwässrige Lösungen dadurch testen, daß man die Lösung auf das Chromatografiepapier aufträgt und das Lösungsmittel verdunsten läßt. Nachfolgend wird destilliertes Wasser zugesetzt und wie üblich getestet.

Alle wichtigen Testergebnisse dieser Arbeit sind nach Kaiser und Specker (11) und nach Pätau (17) statistisch gesichert.

4. Modifizierung der Aufarbeitung auf Hemmstoffe

3 kg gesunder E.cyparissias, welche in der Tiefkühltruhe eingelagert waren, wurden nach dem Zerschneiden in ca. 2 cm große Stücke in einen Mixer gegeben, der zur Hälfte mit Aceton gefüllt war. Die Pflanzen wurden darin zu Brei zerschlagen. Diesem Brei wurde Aceton und Eis zugesetzt bis zum Verhältnis Aceton/Wasser 2:1. Für 3kg Pflanzen wurden 3 l Extraktionsmittel verwendet. Im Kühlschrank wurde bei 4-6°C 36 Stunden extrahiert. Die grüne Lösung wurde abgetrennt, der Rückstand nochmals 24 Stunden mit frischem

Extraktionsmittel angesetzt. Die Extrakte wurden vereinigt und filtriert, der Rückstand verworfen. Aus diesem Pflanzenextrakt verdampften wir bei 60 mm Druck und 48°C Wasserbadtemperatur am Rotationsverdampfer das Aceton. Die tiefdunkelgrün gefärbte Lösung, ca 2 l, schüttelten wir nach dem Ansäuern mit Salzsäure 1:1 auf pH 2,7 (Farbumschlag nach braun) sechs Mal mit je 500 ml Essigester aus. Aus 272 g prim. Kaliumphosphat, 48 g Kalilauge und 2 l destilliertem Wasser stellten wir einen Puffer vom pH-Wert 6,2 her. Die Essigesterlösung wurde 4 mal mit je 500 ml dieses Puffers ausgeschüttelt, dieser wiederum wurde mit Salzsäure 1:1 auf pH 2,5 gebracht und 4 mal mit je 500 ml Essigester ausgeschüttelt. Die hellgelbe Lösung kam in ein Kältebad von -20°C, dabei wurde das gelöste Wasser ausgefroren und abgenutscht. Das Filtrat brachten wir im Vakuum zur Trockene. Von einigen Stufen der Trennung wurden Proben entnommen,im Vakuum eingedampft und gewogen. Auf ihren Gehalt wurden die Konzentrationen beim Mohntest berechnet.

5. Aufarbeitung auf Hemmstoffe präparativ(33)

Die gefrorenen Pflanzen wurden gewogen und mit einer Schere in Stücke geschnitten. Diese brachten wir in einen Mixer, in dem sich schon Aceton befand und zerkleinerten bis ein Pflanzenbrei entstand. Wir füllten ihn in große Glasbotticbe, wobei noch destilliertes Wasser und Eis zugegeben wurden bis das Verhältnis Aceton zu Wasser 2:1 betrug. Für 1 kg Pflanzen setzten wir mindestens 1 l Extraktionsgemisch zu. Die Gefäße wurden dann in einen Kühlschrank von 4-6°C eingestellt und 40-48 Stunden darin belassen. Nach dieser Zeit entfernten wir die Flüßigkeit durch Dekantieren und Pressen des Rückstands, gaben erneut Extraktionsmittel zu und wiederholten die Extraktion. Nach der zweiten Extraktion wurde der Pflanzenrückstand verworfen, die Auszüge vereinigt und am Rotationsverdampfer im Vakuum soweit eingeengt, daß der Rückstand nur noch wässrig war. Er wurde filtriert und mit einem Gemisch von Aktivkohle und Celit 1:1

2 Stunden gerührt, wobei pro 1 kg Pflanzen je 20 g des Sorptionsmittelgemisches verwendet wurden. Die Mischung filtrierten wir durch eine große Nutsche und wiederholten die Kohlebehandlung mit dem Filtrat. Die vereinigten Aktivkohle-Celit Rückstände wurden auf der Nutsche mit destilliertem Wasser gewaschen und dann mit 500 ml Aceton/Wasser 95:5 pro 100 g Rückstand wiederum 2 Stunden gerührt. Diese Behandlung wurde nach dem Abtrennen des Acetons wiederholt. Die Eluate wurden vereinigt und das Aceton im Rotationsverdampfer im Vakuum abgezogen. Wasserbadtemperatur ca. 50°C. Der wässrige Rückstand reagierte schon schwach sauer. Er wurde mit Essigester 4 - 6 mal ausgeschüttelt. Nach sechsmaligem Ausschütteln war die Esterschicht farblos; vorher war sie gelblich. Das in ihr gelöste Wasser froren wir in einem Kältebad aus und trennten das Eis rasch auf einer gekühlten Nutsche ab. Das Filtrat wurde am Rotationsverdampfer im Vakuum zur Trockene gebracht. Mit diesem Rückstand wurden alle weiteren Trennungen durchgeführt.

6. Extraktion der aus dem Essigester gewonnenen Rückstände (Rohsubstanz) mit Chloroform

Eine gewogene Menge Substanz füllten wir in eine Extraktionshülse des Soxhletapparates. Zur Extraktion verwendeten wir über Aluminiumoxid filtriertes Chloroform und Chloroform p.a.Merck. Es wurde jeweils soviel Lösungsmittel verwendet, daß die Hülse nach zweimaligem Abhebern noch zur Hälfte in Chloroform stand. Nach 4 stündiger Extraktion war das abgeheberte Eluat nur noch schwach gelblich, nach 8 Stunden war die Extraktion praktisch vollständig.

7. Craigverteilung der Hemmstoffe

In einer 26 stufigen Verteilungsbatterie mit je 4o ml fassenden Elementen verteilten wir Substanz aus dem Chloroformeluat von Rohsubstanz aus 32 kg gesunden Pflanzen. Die genaue Gewichtsbestimmung der eingesetzten Menge be-

reitete Schwierigkeiten, da sich aus der zähen, braunen Schmiere das Chloroform nur unvollständig entfernen ließ. Wir verteilten zwischen Tetrachlorkohlenstoff Chloroform 4:1 und Methanol Wasser 5:5 als Unter- und Oberphase. Die Ausgangssubstanz (ca. 7-10g) lösten wir in der Unterphase und füllten damit die ersten beiden Elemente.
Nach der Verteilung zeigten die Glieder 0-10 eine abnehmend gelbgrüne Färbung, 11-16 waren schwach gelblich, ab 16 zeigte sich eine zunehmend braune Farbe.

8. Dünnschichtplatten mit Cellulose

Für 5 Platten von 0,25 mm Schichtdicke braucht man 15 g Cellulosepulver MN 300 ohne Bindemittel und 90-100 ml destilliertes Wasser. Um gute Schichten zu erhalten, muß man die Mischung 1 Minute in einem Mixgerät durcharbeiten und nach dem Ausstreichen die Platten langsam mit einem Heizlüfter trocknen. Das ist besonders bei den 1 mm dicken Schichten notwendig, da bei zu raschem Erhitzen Risse in der Schicht auftreten. Für diese Schichten muß man die oben angegebenen Mengen entspredhend vervielfachen.

9. Säulenchromatographie (Gradientenelution)

22 g Kieselgel Merck 0,05-0,20 mm wurden in Chloroform aufgeschlämmt und in eine Chromatographiesäule von 1,5cm Durchmesser und 40 cm Länge eingefüllt. Nach dem Absitzen war die Trennschicht 32 cm hoch. 395 mg Substanz aus dem Chloroformeluat der Rohsubstanz von gesunden Pflanzen lösten wir in Chloroform unter Zusatz einiger Tropfen Methanol p.a. und gaben die Lösung auf die Säule auf. Zunächst wurde mit 180 ml reinem Chloroform die Entwicklung der Zonen begonnen. Nach Durchlauf von 65 ml erschien die erste im UV-Licht blau fluoreszierende Zone am Auslauf.
In zwei hintereinander geschaltete Flaschen mit Auslauf am Boden, füllten wir in die hintere 200 ml Gemisch Chloroform/Methanol 90:10 und in die vordere 190 ml Chloroform

ein. Im vorderen Gefäß sorgte ein Rührer für gute Durchmischung und wir bekamen auf der Säule einen linearen Gradienten von 0-10% Methanol in Chloroform. Einen darauf folgenden Anstieg von 10 auf 100% Methanol erzielten wir mit 50 ml eines Gemisches mit 10% Methanol im vorderen und 75 ml reinem Methanol im hinteren Gefäß. Zuletzt ließen wir noch 30 ml reines Methanol durch die Säule laufen. Mit einem Fraktionssammler fingen wir 80 Fraktionen zu ca. 8,5 ml auf. Diese vereinigten wir nach der chromatographischen Untersuchung in 18 Sammelfraktionen und prüften sie biologisch. Die für den Mohntest errechneten Konzentrationen zeigt die Tabelle:

Fraktion	1	2	3	4	5	6	7
conc.mg/ml	0,242	0,257	0, 105	0,188	0,084	0,127	0,077
Fraktion	8	9	10	11	12	13	14
conc.mg/ml	0,042	0,576	0,274	0,386	0,264	0,340	0,670
Fraktion	15	16	17	18			
conc.mg/ml	0,936	11,70	4,270	0,352			

Die Säulentrennung wurde mit 390 mg Substanz reproduziert. Hier führten wir den Biotest zweimal aus und zwar einmal, indem alle Fraktionen (15 Sammelfraktionen) mit derselben Menge Lösungsmittel gelöst wurden, also bei variabler Konzentration und das zweite mal mit einer konstanten Konzentration von 250 µg/ml.

10. Elektrophorese

Die Versuche führten wir mit einem Gerät der Firma Bender und Hobein München aus. Für die Trennungen verwendeten wir Chromatographierpapier S+S 2043a, 2045a gewaschen und MN 2263 ff (frei von organischen Bestandteilen). Die Streifen waren 4 cm breit. Für mikropräparative Trennungen wurden auch 8 cm und 25 cm breite Streifen benutzt. Für letztere verwendeten wir eine Trennkammer nach Durrum, wobei das Papier zeltförmig aufgehängt wird.

Die Pufferlösungen waren : 0,1 m Natriumcitratpuffer mit destilliertem Wasser 1:1 verdünnt. 0,1 m sekundäres Natriumphosphat ebenfalls 1:1 mit destilliertem Wasser verdünnt und 0,2 n Ammoniak. Bei Citrat- und Phosphatpuffer wurde eine konstante Stromstärke von 10 mA bei Ammoniakpuffer 4 mA eingestellt. Die Spannung fiel während der Trennung von 400 V auf 350 V ab. Die Trennzeiten betrugen etwa 2,5 - 3,5 Stunden.

11. Sprüh- und Nachweisreagenzien (8,15,28)

Als Sprühreagenzien verwendeten wir bei der Prüfung auf Wirkstoffe eine ganze Reihe von Nachweisreagenzien, die im Folgenden kurz beschrieben werden.

1) Jodlösung für organische Verbindungen:
   0,5 g Jod in 100 ml Chloroform.
2) Kaliumpermanganat - Essigsäure: Mischung gleicher Volumenteile von 0,1 n Kaliumpermanganatlösung und 2 n Essigsäure.
3) 2,3,5 - Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC): vor Gebrauch wird 1 Raumteil einer 4%igen wässrigen Lösung von TTC in Methanol mit 1 Raumteil n-Natronlauge gemischt. Es wird jeweils solange erhitzt, bis die roten Flecken deutlich herauskommen, der Untergrund aber praktisch farblos bleibt.
4) Bromphenolblau: 0,05 g Indikator werden in 100 ml Wasser oder Äthanol gelöst. Je nach dem pH-Wert erscheinen die Säuren als gelbe Flecken auf blauem Hintergrund. Basische Substanzen reagieren umgekehrt.
5) Rhodamin B: 0,5 g Rhodamin B werden in 100 ml Äthanol gelöst. Gesättigte, ungesättigte und bromierte Säuren liefern weiße Flecken auf rotem Hintergrund. Im UV-Licht erscheinen blaue Flecken auf rotem Grund. Ähnlich reagieren höhere aliphatische Alkohole.
6) Eisen -III- chlorid: 1%ige wässrige Lösung von $FeCl_3$ und 1%ige methanolische Lösung wurden verwendet.
7) Kaliumferricyanid und Eisen -III- chlorid:
   Lösung I: 1%ige Lösung von Kaliumferricyanid

Lösung II: 1%ige Lösung von Eisen -III- chlorid
Man mischt beide Lösungen unmittelbar vor Gebrauch im Verhältnis 1:1. Blaue Flecken erscheinen bei Anwesenheit von Phenolen und reduzierenden Substanzen. Zur besseren Haltbarkeit der Flecken wäscht man das feuchte Chromatogramm mit verdünnter Salzsäure aus.

8) Kaliumhydroxid: 1%ige Lösung von KOH in Methanol oder Äthanol. Die getrockneten Chromatogramme werden unter der UV - Lampe betrachtet.

9) 2,4 - Dinitrophenylhydrazin (2,4-DNPH): Eine gesättigte Lösung von 2,4-DNPH in 2 n Salzsäure wurde verwendet.

10) Phosphorsäure: Es wurde 3 n Phosphorsäure verwendet. Bei ca. 90°C trocknen und im UV - Licht betrachten.

11) Fuchsinschweflige Säure: ca. 0,2%ige wässrige Lösung wird mit schwefeliger Säure bis zur Entfärbung versetzt.

12) Anilinphthalat: für reduzierende Zucker: 0,93 g Anilin und 1,66 g o-Phthalsäure werden in 100 ml wassergesättigtem n-Butanol gelöst. Das Chromatogramm wird nach dem Besprühen einige Minuten auf 105°C erhitzt. Aldopentosen und 2-Ketohexonsäuren reagieren rot, Aldohexosen und 5-Ketohexonsäuren braun. Im UV - Licht höhere Empfindlichkeit der Reaktion.

13) 4-Methylumbelliferon: 20 mg 4-Methylumbelliferon werden in 35 ml Äthanol gelöst und mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt. Das besprühte Chromatogramm wird unter der UV - Lampe mit Ammoniakdämpfen behandelt, bis maximale Sichtbarkeit der verlöschenden Flecken erzielt wird.

14) N-Bromsuccinimid - Fluoreszein: Das Chromatogramm wird sehr fein mit einer 0,002 m Lösung von N-Bromsuccinimid in zweimal mit Wasser gewaschenem Methylchloroform und nach Verflüchtigung des Lösungsmittels mit einer 0,0003 m äthanolischen Fluoreszeinlösung

besprüht. Organische Schwefelverbindungen erscheinen als grüne Flecken auf rosa Hintergrund; im UV-Licht erscheinen verlöschende Flecken. Empfindlichkeit ca. 1 - 10 µg.

15) Phosphormolybdänsäure: Reagenz auf reduzierende Verbindungen: Frisch zu bereitende 5 oder 10%ige Lösung in Äthanol. 5 Minuten auf 80 - 90°C erwärmen. Blaue oder blaugraue Flecken auf grünem Hintergrund.

16) Reagenz auf Indolylverbindungen:
2 g p-Dimethylaminobenzaldehyd werden in 100 ml 1,2 n HCl gelöst. Vor dem Gebrauch der Lösung verdünnt man mit Äthanol im Verhältnis 1:1. Beim erhitzen auf 70 - 80°C (ca. 15 Minuten) erscheinen rötliche bis blaue Flecken, wenn Indolylverbindungen vorhanden sind.

17) Ninhydrin: 0,2%ige äthanolische Ninhydrinlösung. Bei Anwesenheit von Aminosäuren treten nach dem Sprühen und Erhitzen auf ca. 70°C violette Flecken auf.

12. Tüpfelanalyse nach Feigl (5)

1) Nachweis von Stickstoff durch Erhitzen mit Calciumoxid.
Arbeitsweise: Man mischt eine Spur der Probe in einem Hartglasröhrchen mit einem Gemenge von Kalk und Mangandioxid. Gegebenenfalls wird ein Tropfen der Probelösung in dem Röhrchen zur Trockene (am besten im Vakuum) eingedampt. Der Rückstand wird mit Kalk und Mangandioxid vermischt. Die Öffnung des Röhrchens bedeckt man mit einem Stück Filterpapier, das mit der Reagenzlösung befeuchtet ist, legt einen Glasstopfen darauf und erhitzt langsam zur Rotglut. Je nach der Menge Stickstoff zeigt sich ein schwarzer oder grauer Fleck auf dem Papier. Dieser wird beim Tüpfeln mit Benzidin sofort blau.
Reagenzien: 1. Mischung aus gebranntem Kalk und Mangandioxid 10:1.
2. Mangannitrat - Silbernitratlösung:

2,87 g Mangannitrat werden in 40 ml Wasser gelöst und filtriert. Dazu gibt man eine Lösung von 3,35 g Silbernitrat in 40 ml Wasser und verdünnt die Mischung auf 100 ml. Um die durch Hydrolyse gebildete Säure zu neutralisieren, fügt man verdünntes Alkali tropfenweise zu bis sich ein schwarzer Niederschlag bildet; er wird abfiltriert. Dieses Reagenz hält sich bei Aufbewahrung in einer gut verschlossenen Flasche.

3. Benzidinlösung: 0,05 g Benzidinbase oder - hydrochlorid werden in 10 ml Eisessig gelöst, mit Wasser auf 100 ml verdünnt und filtriert.

2) Nachweis von Schwefel durch Schmelzen mit Alkalimetall
Arbeitsweise: Eine sehr kleine Menge der gepulverten Substanzprobe bringt man in ein kleines Hartglasröhrchen, das auf einer Seite zu einer Kugel aufgeblasen ist. Bei Verwendung einer Lösung wird ein Mikrotropfen zur Trockene verdampft (im Vakuum). Ein kleines Stückchen Kalium von der Größe eines Stecknadelkopfes wird mit einem kleinen Glasstab eingeführt, wobei an der Wand haftende Substanz mit dem Kalium abgestreift wird. Man erhitzt dann das Röhrchen vorsichtig vom offenen Ende her bis das Kalium schmilzt und sich mit der Substanz vermischt. Schließlich bringt man das Röhrchen kurze Zeit zur Rotglut und taucht es dann in ein Mikroreagenzglas mit 5 Tropfen Wasser. Ohne die Glassplitter und die Kohleteilchen abzufiltrieren, werden 1 Tropfen Cadmiumacetat und dann 1 - 2 Tropfen Essigsäure zugesetzt und nach dem Abkühlen 1 oder 2 Tropfen Jodazid zugefügt. Ist eine Schwefelverbindung anwesend, so sieht man Stickstoffbläschen aufsteigen.
Reagenzien: 1. Metallisches Kalium
2. 20%ige Cadmiumacetatlösung
3. 20%ige Essigsäure
4. Natriumazid - Jodlösung: 3g Natriumazid werden in 100 ml o,1 n Jodlösung gelöst. Das Reagenz ist beständig.

3) Nachweis saurer Verbindungen

Arbeitsweise: Die Reaktion wird in einem Mikroprobe-röhrchen durchgeführt, das mit einem Glas- oder Gummi-stopfen versehen ist. Man bringt einen Tropfen alkoholische Lösung der Säure und je einen Tropfen Jodid- und Jodatlösung in das Reagenzglas. Es wird verschlossen, für eine Minute in kochendes Wasser gehalten und dann abgekühlt. Dann gibt man einen Tropfen Stärkelösung zu und schüttelt um. Sind Säuren zugegen, so tritt eine blauviolette Farbe auf.

Reagenzien: 1. Kaliumjodid 2%ig in Wasser
2. 4%ige Kaliumjodatlösung
3. 0,1%ige Stärkelösung

4) Nachweis von Enolen

Arbeitsweise: Zu einem Tropfen der Probelösung setzt man Bromwasser bis zur bleibenden Gelbfärbung zu. Dann gibt man Sulfosalizylsäure bis zur Entfärbung zu und versetzt mit wenigen Tropfen Kaliumjodidlösung und Stärkelösung. Blaue Farbe zeigt Anwesenheit von Enolen an.

Reagenzien: 1. Gesättigtes Bromwasser
2. gesättigte wässrige Lösung von Sulfosalicylsäure
3. Kaliumjodid 5%ig
4. Stärkelösung

5) Nachweis von Carbonylverbindungen

Arbeitsweise: Man mischt einen Tropfen der alkoholischen oder wässrigen Probelösung mit einem Tropfen einer etwa 0,001 n Hydrogensulfitlösung. Nach etwa 5 Minuten setzt man einen Tropfen einer annähernd 0,001 n Jodlösung zu, so daß auf Zusatz eines Tropfens Stärkelösung eine ganz schwache Blaufärbung eintritt. Bleibt die blaue Farbe bestehen, so ist die Reaktion positiv und zeigt die Gegenwart von Aldehyd oder Keton an.

Reagenzien: 1.ca. 0,001 n Natriumhydrogensulfit
2. ca. 0,001 n Lösung von Jod in Kaliumjodid
3. 1%ige Stärkelösung, durch Jod leicht angefärbt.

Die Konzentration des Reagenz 1. und 2. soll so eingestellt werden, daß 10 Tropfen der Hydrogensulfitlösung 11 oder 12 Tropfen der Jodlösung verbrauchen, um eine dauernde Blaufärbung zu geben.

6) Nachweis von Methylenketonen
Arbeitsweise: Man mischt einen Tropfen der wässrigen oder alkoholischen Probelösung in einem Mikrotiegel mit einem Tropfen Nitroprussidnatriumlösung und einem Tropfen Natronlauge. Nach kurzer Zeit entwickelt sich gewöhnlich eine schwache Färbung, wonach man 1 oder 2 Tropfen Eisessig zusetzt. Rote oder blaue Farbe zeigt die Anwesenheit eines Methylenketons.
Reagenzien: 1. Nitroprussidnatrium 5%ig,
2. Natronlauge, 30%ig
3. Eisessig

7) Nachweis primärer und sekundärer Alkohole
Arbeitsweise: In ein Mikroreagenzglas gibt man 1 Tropfen der ätherischen Probelösung, 1 Tropfen Schwefelkohlenstoff und wenige Zentigramm festes Natriumhydroxid. Die Mischung wird etwa 5 Minuten geschüttelt. Dann setzt man 1 oder 2 Tropfen Molybdatlösung zu, säuert sobald das Alkali gelöst ist, vorsichtig an und schüttelt mit 2 Tropfen Chloroform. Bei Gegenwart primärer oder sekundärer Alkohole wird die Chloroformschicht violett. Verbindungen mit der Gruppe $-CH_2-CO-CH_2-$ reagieren ebenfalls. Es entstehen aber in Chloroform unlösliche, schokoladebraune Niederschläge.
Reagenzien: 1. Schwefelkohlenstoff
2. Alkalihydroxid, feingepulvert
3. Ammoniummolybdat 1%ige Lösung
4. Schwefelsäure 2 n
5. Chloroform.

13. Trennung der Fraktion 3 an Polyamid präparativ

In eine Chromatographiesäule von 5 cm Durchmesser und 100 cm Länge füllten wir 120 g Polyamid Woelm trocken ein. Es wurde destilliertes Wasser aufgegeben und der

Hahn der Säule nach Durchlauf von einigen 100 ml Wasser geschlossen. Über Nacht ließen wir die Füllung unter destilliertem Wasser stehen. Am folgenden Tag wurde die Säule nochmal mit ca. 1 l Wasser gewaschen. Daraufhin gaben wir 200 ml des 3%igen wässrigen Extrakts von Fraktion 3 des Trennungsganges (wässriger Rückstand nach der Kohlebehandlung) auf die Säule und begannen mit der Entwicklung der Zonen. Nacheinander setzten wir 2 l destilliertes Wasser, 3 l Methanol, 2 l Methanol/Aceton 1:1 und 2 l Aceton durch die Säule. Das Eluat nahmen wir in Portionen von 25 ml mit dem Fraktionssammler auf. Nach der Dünnschichtchromatographie auf Cellulose in n-Propanol/Essigester/Wasser 6:1:3 und Aceton/Wasser 6:4 vereinigten wir gleiche Einzelfraktonen wieder. Die Fraktionen I - VI enthielten folgende Mengen Substanz:

I 0,0054 g
II 1,9529 g
III 2,0141 g
IV 0,0468 g
V 0,0217 g
VI 0,0106 g

Der Mohntest wurde mit Lösungen der Fraktionen in Methanol durchgeführt.

Literaturverzeichnis

(1) Bellamy, L.J. Ultrarotspektren und chemische Konstitution D. Steinkopf, Darmstadt 1955
(2) Benoni, H.Dissertation Erlangen 1962
(3) Bonner, J. und A.W.Galston Bot. Gaz. 106,185 (1944)
(4) Evenari,M. Bot. Rev. 15, 153-194 (1949)
(5) Feigl,F. Tüpfelanalyse Band II org. Teil 4.deutsche Auflage Akademische Verlagsgesellsch.Ffm.1960
(6) Ferenczy,L. Acta Biol. 8,31-37 (1957-58)
(7) Grümmer,G. Die gegenseitige Beeinflußung höherer Pflanzen Allelopathie VEB G.Fischer Jena 1955 zitiert nach Handbuch der Pflanzenphysiologie Band XI S. 655
(8) Hais,J.M. und K.Macek Handbuch der Papierchromatografie Band I VEB G.Fischer Jena 1958 S.735 f.
(9) Hartwich,W. Phytopath. Z. 24, 73 - 96 (1955)
(10) Jordi,E. Zentralbl. für Bakt. II 13, 64 (1904)
(11) Kaiser,H. und H.Specker Zeitschr. für analyt.Chem. 149, 46 - 66 (1956)
(12) Klebahn,H. Zeitschr. für Pflanzenkrankh. 22,321 (1912)
(13) Libbert,E. aus H.Linser und O.Kiermayer Methoden zur Bestimmung pflanzlicher Wuchsstoffe Springer Verlag Wien 1957 S. 155
(14) Mayer,A.M. und M.Evenari J. Exptl. Bot. 4,257 (1953)
(15) Merck,E. Chromatografie S. 135f. Darmstadt
(16) Moehrke,L. Bot. Arch. 18,347 - 58 (1927)
(17) Pätau,K. Biol. Zbl. 63, 152-68 (1943)
(18) Pilet,P.E. Experientia 9, 300-303 (1953)
(19) Pilet,P.E. Phytopath. Z. 31, 162-79 (1957)
(20) Rademacher,B. Gegenseitige Beeinflußung höherer Pflanzen in Handbuch der Pflanzenphysiologie von W.Ruhland Band XI Heterotrophie Springer Verlag Berlin-Göttingen-Heidelberg 1959 S.655-706
(21) Radley,M. Ann. of Botany 22, 297 (1958)
(22) Reichling,P. Diplomarbeit Erlangen 1961
(23) Schildknecht,H. und G.Rauch Z. Naturforschg. 16, 422-29 (1961)

(24) Schildknecht,H. und H.Benoni Z. Naturforschg.
im Druck
(25) Schröter,J. Hedwigia 14, 98-100 (1875)
(26) Schwemmle,J. Biol. Zbl. 68, 195-231 (1949)
70, 193-252 (1951)
71, 152-183 (1952)
(27) Stämpfli,R. Hedwigia 49, 230 (1910)
(28) Stahl,E. Dünnschichtchromatografie Springer Verlag
Berlin-Göttingen-Heidelberg 1962 S.497f.
(29) Stowe,B. und T.Yamaki Ann. Rev. Plant Physiol.
8, 181 (1957)
(30) Tischler,G. Flora 104, 1-64 (1912)
(31) Turian, M.G. und M.R. Heim Compt. rend.244,3167(1957)
(32) Varga,M. und E.Köves Acta Biol. 9, 369-378 (1958-59)
(33) West,Ch.A. und B.O. Phinney Journ.Am. Chem.Soc.
81, 2424 - 27 (1959)

Lebenslauf

Am 13. Mai 1935 wurde ich als Sohn des Oberkellners Valentin Reichling und seiner Ehefrau Katharina, geborene Faber, zu Nürnberg geboren.

Vom September 1941 bis Dezember 1945 besuchte ich die Volksschule in Nürnberg. Am 18. Dezember 1945 trat ich in die Oberrealschule an der Löbleinstraße in Nürnberg ein, wo ich am 13. Juli 1954 die Reifeprüfung ablegte.

Im Wintersemester 1954/55 immatrikulierte ich mich an der Universität Erlangen-Nürnberg für das Chemiestudium. Hier bestand ich am 15. Januar 1958 die Diplomchemiker-Vorprüfung und am 19. Januar 1960 die Diplom-Chemiker-Hauptprüfung. Anschließend fertigte ich die Diplomarbeit und die vorliegende Dissertation am Institut für Organische Chemie an.

Im November 1963 habe ich geheiratet.

Fotodruck

– Wiltrud Hogl, Erlangen, Brüxer Straße 9, Telefon 16 36 –